
Bachelorarbeit

Frau
Liana Rommel

Molekulargenetische Untersuchung
der Zusammensetzung der
mikrobiellen Lebensgemeinschaft im
Flutungswasser der Grube Königstein
und Nachweis sulfatreduzierender
Bakterien (SRB)

Mittweida, 6.10.2011

Bachelorarbeit

Molekulargenetische Untersuchung
der Zusammensetzung der
mikrobiellen Lebensgemeinschaft im
Flutungswasser der Grube Königstein
und Nachweis sulfatreduzierender
Bakterien (SRB)

Autor:

Frau

Liana Rommel

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI08w1-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil Wünschiers

Zweitprüfer:

Frau Dr. Heike Fischer

Einreichung:

Mittweida, 6.10.2011

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2011

Faculty
Faculty Mathematics / Natural Sciences /
Computer Sciences

Bachelor Thesis

Molecular genetic analysis of the
composition of the microbial
community in the flood water of the
Königstein mine and detection of
sulfate-reducing bacteria (SRB)

Author:

Ms.

Liana Rommel

Course of studies:

Biotechnology/Bioinformatics

Seminar group:

BI08w1-B

First examiner:

Prof. Dr. rer. nat. habil Wünschiers

Second examiner:

Dr. Heike Fischer

Submission:

Mittweida, 6.10.2011

Defence/ Evaluation:

Mittweida, 2011

Bibliografische Beschreibung

Rommel, Liana:

Molekulargenetische Untersuchung der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Flutungswasser der Grube Königstein und Nachweis sulfat-reduzierender Bakterien (SRB). - 2011. - 46 Seiten. - Mittweida, Hochschule Mittweida (FH), Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, - 2011

Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wird die Untersuchung verschiedener Wasser- und Sedimentproben der ehemaligen Uranerzgrube Königstein, sowie der Gruben Pöhla und Schlema auf mikrobielle Lebensgemeinschaften thematisiert. Dies wird unter Verwendung molekulargenetischer Methoden, wie PCR, T-RFLP-Analyse und Klonierung durchgeführt. Anschließend wird durch einen Abgleich mit bereits vorhandenen Daten aus vorangegangenen Untersuchungen die Identifizierung der Organismengruppen vorgenommen und die Diversität festgestellt. Weiterhin werden erhaltene Klonsequenzen hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit bestimmter Bakterienstämme analysiert und zugeordnet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Danksagung.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Standortcharakterisierung	1
1.1.1 Uranerzgrube Königstein.....	1
1.1.2 Technikumsversuche.....	3
1.1.3 Grube Schlema.....	3
1.1.4 Grube Pöhla.....	4
1.2 Geomikrobiologie.....	4
1.3 Reaktionen von Schwefelverbindungen	5
1.3.1 Sulfatreduktion.....	8
1.4 Eisenoxidation.....	12
1.5 Uranreduktion.....	14
1.6 Fingerprinting und T-RFLP	16
1.7 Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Proben.....	18
2.1.2 Kits.....	18
2.1.3 Chemikalien.....	19
2.1.4 Geräte.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Vorbehandlung der Proben.....	21
2.2.2 DNA-Extraktion und PCR.....	21
2.2.3 Aufreinigung und Gelelektrophorese.....	23
2.2.4 T-RFLP Analyse aller Proben.....	23
2.2.4.1 T-RFLP.....	23
2.2.4.2 Fragmentanalyse.....	24
2.2.4.3 Phylogenetische Analyse.....	25

2.2.5 Sequenzierung der Probe k-8040.....	25
2.2.5.1 Ligation und Transformation.....	25
2.2.5.2 Überimpfung der Klone.....	26
2.2.5.3 Überprüfung der Klone.....	26
2.2.5.4 Anlegen von Gefrierkulturen.....	27
2.2.5.5 Sequenzierung der Klone.....	28
2.2.5.6 Sequenzanalyse.....	28
3 Ergebnisse.....	30
3.1 PCR und Gelelektrophorese.....	30
3.2 T-RFLP-Analyse.....	31
3.2.1 DNA-Konzentration und Diversität.....	31
3.2.2 Phylogenetische Zuordnung.....	33
3.3 Sequenzierung der Probe k-8040.....	36
3.3.1 Klonierung.....	36
3.3.2 Sequenzierung.....	37
4 Diskussion.....	38
4.1 T-RFLP-Analyse.....	38
4.1.1 Phylogenetische Einordnung der Fragmente.....	39
4.1.2 Ökologie der Organismen verschiedener Standorte.....	40
4.2 Sequenzanalyse.....	42
4.2.1 Phylogenetische Einordnung der Sequenzen.....	43
4.2.2 Standort Königstein.....	44
5 Zusammenfassung.....	46
6 Literaturverzeichnis.....	47
Selbstständigkeitserklärung.....	53
Anlagen.....	VII
Anlage 1: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Proben.....	VIII
Anlage 2: Gelelektrophorese der Klone 1-150 (amplifiziert mit den Primern T3/T7). ..	XII
Anlage 3: Elektropherogramme der T-RFLP-Analyse der Zusatzproben	XVI
Anlage 4: Ausgewählte Klonsequenzen der Probe k-8040.....	XX
Anlage 5: BLAST-Ergebnisse der Klonsequenzen der Probe k-8040.....	XXVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schwefelkreislauf in oxischen und anoxischen Bereichen [Fritsche, 1999]....	6
Abbildung 2: Sulfatreduktion [Schlegel, 1992].....	10
Abbildung 3: Ausschnitt eines Elektropherogramms.....	24
Abbildung 4: Ausschnitt eines Chromatogramms Positionen 8-35.....	28
Abbildung 5: Ausschnitt eines Chromatogramms Positionen 1003-1033.....	29
Abbildung 6: PCR Ergebnisse der Wasserproben.....	30
Abbildung 7: PCR Ergebnisse der Sedimentproben.....	30
Abbildung 8: PCR Ergebnisse der Zusatzprobe.....	31
Abbildung 9: Ergebnisse der DNA-Extraktion und PCR der Probe k-8040.....	31
Abbildung 10: Phylogenetischer Baum (Proben 2-10).....	36
Abbildung 11: Phylogenetischer Baum ausgewählter Klone.....	37
Abbildung 12: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Baum (Proben 2-10) I.....	39
Abbildung 13: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Baum (Proben 2-10) II.....	40
Abbildung 14: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Baum ausgewählter Klone	43
Abbildung 15: Phylogenetischer Baum (Probe k-8040).....	44
Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Bakterienstämme anhand der analysierten Klone der Probe k-8040	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schwefeloxidierende Prokaryonten [Reineke & Schlömann, 2007].....	7
Tabelle 2: Phylogenetische Gruppen sulfatreduzierender Prokaryonten.....	9
Tabelle 3: Phylogenetische Gruppen eisenoxidierender Prokaryonten.....	13
Tabelle 4: Übersicht aller bearbeiteten Proben.....	18
Tabelle 5: Sequenzen der Primer 27f und 1404r.....	22
Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes	22
Tabelle 7: Temperaturprogramm für die Amplifikation der 16S rDNA.....	22
Tabelle 8: Erkennungssequenzen der Enzyme.....	24
Tabelle 9: Zusammensetzung LB-Amp-Agar.....	26
Tabelle 10: Sequenzen der Primer T7 und T3.....	27
Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (20 µl).....	27
Tabelle 12: Temperaturprogramm für die Amplifikation des Fragmentes mit den Primern T7/T3.....	27
Tabelle 13: Zusammensetzung LB-Amp-Medium.....	28
Tabelle 14: DNA-Konzentrationen der Proben 2-12.....	32
Tabelle 15: Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften.....	32
Tabelle 16: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Wasser-Proben	33
Tabelle 17: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Sediment-Proben	34
Tabelle 18: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Zusatzproben.....	35
Tabelle 19: Ergebnisse der Auszählung.....	36

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ASR	Assimilatorische Sulfatreduktion
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DMF	N,N - Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSR	Dissimilatorische Sulfatreduktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
KBE	Koloniebildende Einheit
kbp	Kilobasenpaar
LB	Lysogeny Broth
n.K.	negative Kontrolle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotid
PAP	Phosphoadenosin-5'-phosphat
PAPS	3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat
PPi	Diphosphat
rpm	revolutions per minute
SDAG	Sowjetisch-Deutsche Aktiengesellschaft (1946-1990)
SLS	Sample Loading Solution
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
Std	Standard
T-RF	terminaler Restriktionsfragment
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlorin-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei Frau Susan Ehinger bedanken, die es mir ermöglicht hat dieses interessante Thema zu bearbeiten und die mir stets mit vielen Ratschlägen geholfen hat. Ich habe wirklich viel von Ihnen gelernt und konnte durch die Zusammenarbeit viele Erfahrungen sammeln.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Heike Fischer dafür danken, dass sie sich bereit erklärt hat, meine Betreuung zu übernehmen und anschließend meine Arbeit zu begutachten. Vielen Dank dafür, dass Sie sich Zeit für mich genommen haben.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wünschiers für seine fachliche Unterstützung und Beratung. Zudem bedanke ich mich bei Ihnen, dass Sie sich bereit erklärt haben, die Arbeit als Erstgutachter zu beurteilen.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank an Herr Dr. Eberhard Janneck, Frau Patzig, Herr Knabe und Herr Martin richten, die mir bei praktischen oder theoretischen Fragen immer geholfen haben und dazu beitrugen eine angenehme Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Zudem möchte ich Frau Gniese von der TU Bergakademie Freiberg dafür danken, dass sie sich für meine Fragen Zeit nahm und mir beim Verständnis wichtiger Programme sehr geholfen hat.

Zum Schluß möchte ich mich besonders bei meiner Mutter und meinen Freunden danken, die mir stets zur Seite gestanden und mich bei allem unterstützt haben.

Vielen Dank!

1 Einleitung

Die ehemalige Uranerzgrube Königstein der Wismut GmbH ist der Beispielstandort für die Minimierung von Restschäden in unterirdischen Schadensherden nach aktiver Sanierung durch die Entwicklung reaktiver Zonen. Geringe Schadstoffkonzentrationen gelangen in ehemaligen Bergbaugebieten über längere Zeiträume in die Umgebung. So enthält das Flutungswasser der Grube aufgrund der bergbaulichen Oxidation hohe Konzentrationen an mobilen Schadstoffen, wie Uran, Arsen und Schwermetallen.

Eine besondere Rolle bei der Immobilisierung dieser Stoffe spielen autochthone autotrophe sulfatreduzierende Mikroorganismen. Durch ihre Nutzung wird die Fällung von Eisensulfiden und reduzierten Schadstoffen angestrebt. Dabei wird der Stoffwechsel der Organismen über das elementare Eisen mit dem Elektronendonator H_2 angeregt. Die Umbildung von Eisensulfiden zu Eisen(hydr)oxiden bei Kontakt mit oxidierten Grundwässern kann eine dauerhafte Schadstoffimmobilisierung bewirken [Kassahun *et al.*, 2010].

1.1 Standortcharakterisierung

1.1.1 Uranerzgrube Königstein

Die SDAG Wismut begann bereits 1961 mit der Erkundung der Lagerstätten im Gebiet der sächsischen Elbtal-Kreideformation. Der konventionelle Uranerzabbau wurde ab 1967 betrieben. Die Uranerzgrube Königstein wies einen Gesamtvorrat von ca. 30 000 t Uran auf. Aufgrund relativ niedriger Urangehalte im Sandstein wurde der Abbau unter Tage 1984 auf effektivere, chemische Verfahren (in-situ-Laugung) umgestellt. Dazu wurde schwefelsaure Lösung eingesetzt, die in Bohrlöcher oder gesprengte Kammern eingeleitet wurde. Das Uran wurde aus der Lösung in einer Aufbereitungsanlage gewonnen. Über 55 Millionen Tonnen Gestein kamen so bis 1990 mit schwefelsaurer Lösung in Kontakt. Ein Teil der Lösung ist als Porenwasser im Sandstein geblieben und führte zur weiteren Mobilisierung von Uran und Schwermetallen [URL 1]. Diese Stoffe werden jahrhundertlang freigesetzt und kontaminieren das Grundwasser.

Seit der Einstellung des Bergbaus wird die aktive Sanierung vom Eigentümer Wismut GmbH betrieben. Dabei sollen die vom Bergbau beanspruchten Flächen wieder nutzbar gemacht werden. Die Sanierung erfolgt seit 2001 durch gesteuerte Flutung des Bergwerkes [URL 1]. Die erwartete Uranmenge bei der kontrollierten Flutung wird auf ca. 2200 t Uran

geschätzt [URL 3]. Das Flutungswasser wird zunächst in einer Aufbereitungsanlage behandelt und nach vollständiger Abtrennung des gelösten Urans einer Wasserbehandlungsanlage zugeführt. Anschließend wird das Wasser in die Elbe eingeleitet [URL 1]. Die Flutung der Grube wird voraussichtlich 2015 abgeschlossen sein [URL 2]. Die vollständige Sanierung ist zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht beendet, denn das mit Radionukliden und Schwermetallen belastete Flutungswasser wird solange ausgefördert und der Wasserbehandlungsanlage zugeführt, bis keine Beeinflussung der Grundwasserleiter und der Elbe mehr eintritt [URL 1]. Diese Behandlung wird ungefähr einen Zeitraum von 20 bis 30 Jahren einnehmen [URL 2].

Das Flutungswasser ist aufgrund der Sulfidoxidation durch schwefelsaure Laugung mit pH 2,8-2,9 stark sauer. Zudem ist es oxidierend und mit mehreren hundert mg/l Sulfat und ca. hundert mg/l Eisen(III) sowie Kontaminationen mit Uran, Zink und Schwermetallen (Co, Cr, Ni, Pb) hoch mineralisiert. Weiterhin sind im Grundwasser Eisen(III) und Uran(VI) und im Porenwasser Eisenschlämme (Biofilmablagerungen) und gelöstes Sulfid enthalten. Aufgrund des Schadstoffpotentials können Außenwirkungen über Jahrzehnte bis Jahrhunderte auftreten.

Eine dauerhafte Immobilisierung der Schadstoffe soll durch aktiv stimulierte Sulfatreduktion und Fällung von Eisensulfiden, sowie mikrobielle Uranreduktion und passive Rückoxidation der Eisensulfide mit Ausfällung von Eisen(III)(hydr)oxiden erreicht werden. Des Weiteren sind die Oberflächen des elementaren Eisens zur abiotischen Uranreduktion und Schadstoffsorption fähig.

Die Grube wurde in vorangegangenen Arbeiten auf Schadstoffe, deren Bindungsformen, reaktive Mineralien und Vorhandensein von autochthonen Mikroorganismen hin untersucht. Der Nachweis erfolgte an Wasser- und Sedimentproben. Dazu wurde eine Klonbank für Sandstein- und Eisenschlammproben erstellt, mit deren Hilfe die mikrobielle Diversität nachgewiesen wurde. Die Schlämme enthalten sulfatreduzierende Bakterien und wirken so als Katalysator mikrobieller Reduktionsprozesse, wobei die Sulfatreduzierer die neutralen, reduzierten Schlammproben und die Eisenoxidierer die sauren Schlammproben dominieren. Sowohl der heterotrophe als auch der autotrophe Stoffwechsel ist möglich. Die Flutungs- und Grundwässer weisen eine sehr geringe mikrobielle Diversität auf. Die oxidierten Schadstoffe liegen entweder gelöst im Flutungs- und Porenwasser, im Ionenaustauscher (U, Pb, Zn, Cd) gebunden oder an organisches Material (Pb) und Eisen(hydr)oxide (U, Pb, Zn, As) assoziiert vor [Kassahun *et al.*, 2010].

1.1.2 Technikumsversuche

In den Technikumsversuchen TV2-TV4 wurden geochemische und mikrobielle Prozesse der reaktiven Zone in der gefluteten Grube nachgestellt. Dazu wurden Glassäulen mit Grubenwässern, Grubengesteinen, Eisenschlämmen und reaktivem Material befüllt und mit Flutungswasser durchströmt. Die anaerobe Eisenkorrosion am reaktiven Material führte zur Freisetzung von Wasserstoff als Elektronendonator für die autotrophen autochthonen sulfatreduzierenden Bakterien. Durch das Vorhandensein von H_2S , elementarem Schwefel und neugebildeten sulfidischen Mineralen wurde der Ablauf mikrobieller Sulfatreduktion nachgewiesen. Die Technikumsversuche konnten erfolgreich aufzeigen, dass an reaktivem Material eine effektive Schadstoffimmobilisierung in verschiedenen Mineralneubildungen stattfindet. Mineralneubildungen wurden auf der Oberfläche des reaktiven Minerals, aber auch im Unterkorn der Versuchssäulen angereichert, sodass in den Abläufen der Versuche keine Schadstoffe außer Arsen nachgewiesen werden konnten [Kassahun *et al.*, 2010].

1.1.3 Grube Schlema

Die Grube Schlema liegt im Südwesten Sachsens, nordwestlich der Niederlassung Aue. Mit dem Abbau wurde 1947 begonnen. In den Produktionszeiten bis 1990 wurden hier ungefähr 80.000 Tonnen Uran durch die SDAG Wismut gewonnen. 1991 begann die gesteuerte Flutung der Grube nach dem Abstellen der Pumpen. Die Steuerung der Flutungsgeschwindigkeit hängt dabei direkt mit der Menge des zu reinigenden Grubenwassers zusammen. Der überwiegende Teil der Hohlräume des Grubenfeldes wurde bereits bis 2008 geflutet [URL 8]. Durch den Uranerzabbau wurde das ehemalige Radiumbad Schlema zerstört. Im aufsteigenden Wasser der Grube sind Schadstoffe, wie Uran, Radium, Arsen und Mangan enthalten, die entfernt werden müssen bevor das Wasser in den Vorfluter Zwickauer Mulde eingeleitet werden darf. Das Flutungswasser wird nach der Entnahme aus der Grube über ein Pumpsystem der Wasserbehandlungsanlage Schlema-Alberoda der Wismut GmbH zugeführt, wo es behandelt wird. Die Anlage besteht aus zwei etwa baugleichen Straßen, die im Abstand von zwei Jahren (1998 und 2000) den Dauerbetrieb aufnehmen. Durch die Behandlung verringert sich der Schadstoffgehalt des Wassers um 90 %. Die Wasserbehandlungsanlage Schlema-Alberoda wird insgesamt etwa 30 Jahre in Betrieb sein [URL 9].

1.1.4 Grube Pöhla

Weiterhin gehört zum Sanierungsterritorium der Niederlassung Aue das Grubenfeld Pöhla. Pöhla liegt im oberen Westerzgebirge nah der tschechischen Grenze. Der Bergbau wurde hier von 1967 bis 1991 betrieben, mit einem Gewinn von ungefähr 1.200 Tonnen Uran. 1988 waren die letzten Bergarbeiten abgeschlossen.

Die Flutung des Bergwerkes begann 1992 und ist bereits 1995 mit Erreichen der Stolln-Sohle beendet. Die Sanierung des Uranbergbaus ist schon weit fortgeschritten. Sämtliche Anlagen und technologische Komplexe wurden bereits abgerissen. 2008 wurde der Wasser-, Wege- und Landschaftsbau, nach der Abdeckung der Betriebsfläche und der Luchsbachhalde mit Mineralboden, abgeschlossen. Die Kernsanierung ist damit beendet. Jedoch stand die Behandlung des mit Schadstoffen (Radium, Arsen, Eisen, Uran) kontaminierten Grubenwassers noch an. Dazu wurde das anfallende Flutungswasser in zwei Teilströmen getrennt abgeleitet und einer Wasserbehandlungsanlage zugeführt, mit der die Schadstoffe aus dem Flutungswasser ausgefällt wurden. Bereits 1997 war die Urankonzentration im Flutungswasser unter dem genehmigten Einleitwert gesunken, sodass die Uranabtrennung eingestellt wurde [URL 9].

1.2 Geomikrobiologie

Geomikrobiologie befasst sich mit den Aktivitäten von unter der Erdoberfläche lebenden Mikroorganismen und den Einflüssen ihrer Stoffwechselvorgänge auf die Schichten der Erde. Bakterien haben eine entscheidende Bedeutung im Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Kreislauf. Weiterhin leben viele der Bakterien, die an geomikrobiologischen Prozessen beteiligt sind, unter extremen Bedingungen, wie Temperatur, Druck, Säure, Salzkonzentration oder Strahlung, weshalb sie als extremophil bezeichnet werden. Diese und andere Bakterien haben sich an die Abwesenheit von Licht und Sauerstoff angepasst und verwenden die umgebenden Materialien als Brennstoff für das Überleben und das Wachstum [URL 4].

Geomikrobiologische Untersuchungen wurden bereits im 19. Jahrhundert durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen sedimentären Eisenausscheidungen und Mikroorganismen festzustellen. Dabei bekam *Gallionella ferruginea* eine entscheidende Bedeutung. 1928 wurde nachgewiesen, dass autotrophe Eisenbakterien wesentlichen Anteil an der biogenen Erzbildung in Lagerstätten haben. Als Lagerstätten werden räumlich begrenzte geologische Körper der Erdkruste bezeichnet, die natürliche Anreicherungen nutzbarer Rohstoffe enthalten. Dabei werden die Bakterien unterteilt in autochthone Mikroorganismen, die aus

der Periode der Ablagerung des betreffenden Sedimentes stammen und in allochthone Mikroorganismen, die das Sediment erst nach seiner Entstehung besiedelt haben. Diese Keime sind sehr empfindlich. Sie vertragen oft den plötzlichen Wechsel in die üblichen nährstoffreichen Medien nicht, was ihren Nachweis erschwert. Zudem sind oft die Bedingungen des natürlichen Standortes nicht ausreichend bekannt [Köhler & Völsge, 1998]. Außerdem wurde in den 20er Jahren festgestellt, dass für die Produktion von Schwefelwasserstoff im Wasser aus Ölfeldern sulfatreduzierende Bakterien verantwortlich sind [URL 4]. Vermutlich wurden mikrobielle Laugungsprozesse bereits seit mehreren hundert Jahren von Menschen verwendet, jedoch ohne, dass sie Kenntnis von den beteiligten Mikroorganismen besaßen. Doch erst 1947 konnte das eisenoxidierende Bakterium *Thiobacillus ferrooxidans* entdeckt und isoliert werden, was einen Grundbaustein für die Entwicklung biogeotechnologischer Verfahren zur Gewinnung von Metallen darstellt. Es wurden zunächst Kupfer und Uran aus sulfidischen Erzen unter Verwendung autotropher Mikroorganismen gewonnen. Doch nun werden Bakterien in der Umwelt für vielfältige Prozesse genutzt, unter anderem zur mikrobiellen Metallgewinnung, Eigenschaften-verbesserung von Rohstoffen oder mikrobieller Reinigung von kontaminierten Wässern und Böden [Köhler & Völsge, 1998]. In den 70er Jahren wurde die Beteiligung von Bakterien beim Abbau von radioaktiven Substanzen entdeckt. So kann ein Bakterium der *Thermus* sp. Uran, Eisen, Chrom und Kobalt nutzen.

Forschungen im Bereich der Geomikrobiologie können Informationen über die Entwicklung des Lebens auf der Erde liefern. So waren einige Mikroorganismen bei der Gestaltung der Atmosphäre entscheidend. Die Aufklärung ihrer Struktur und Metabolismus kann für das Verständnis der Vorgänge bei der Entwicklung von Lebewesen behilflich sein. Des Weiteren wird Geomikrobiologie weiter an Bedeutung gewinnen, da sie zur Entdeckung einer großen Anzahl und Vielfalt weiterer Mikroben auf der Erde führt [URL 4].

1.3 Reaktionen von Schwefelverbindungen

Schwefel bildet 0,2 % der Biomasse auf der Erde [Reineke & Schlömann, 2007]. Schwefelverbindungen kommen in reduzierter Form in der Natur vor allem im Boden in Form von Gesteinen als Sulfide und in Gewässern als Schwefelwasserstoff vor [Fritsche, 1999].

Im Schwefel-Kreislauf sind viele unterschiedliche Reaktionen enthalten, denn außer Sulfid und Sulfat treten verschiedene intermediäre Schwefelverbindungen, wie Sulfit, Thiosulfat, Trithionat und Tetrathionat, auf. Aber auch elementarer Schwefel kann von einigen

Bakterien als Schwefelquelle oder als Elektronenakzeptor genutzt werden [Cypionka, 2010]. Der Schwefelkreislauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

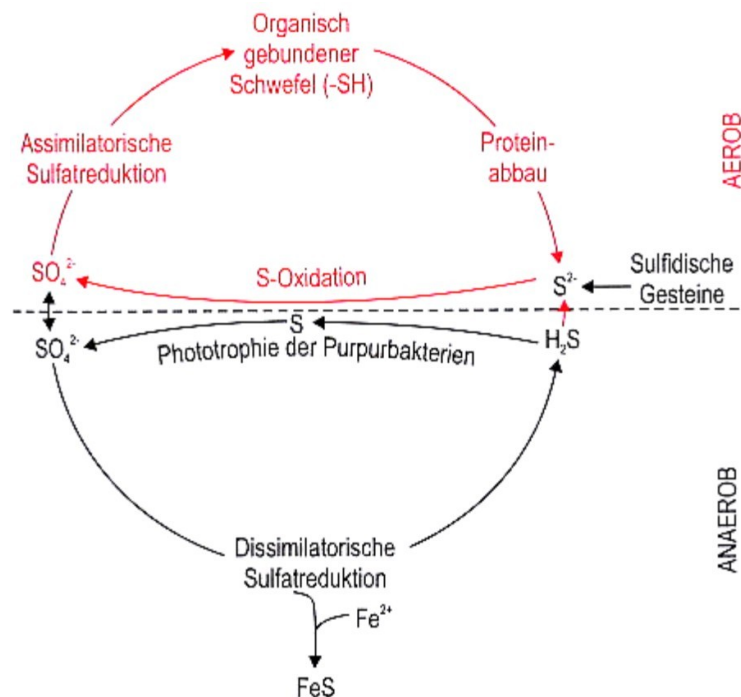


Abbildung 1: Schwefelkreislauf in oxischen und anoxischen Bereichen [Fritsche, 1999]

Die Reduktion von elementarem Schwefel wird größtenteils durch S^0 -Reduzierer vorgenommen, die phylogenetisch von den sulfatreduzierenden Bakterien verschieden und unfähig sind, Sulfat zu H_2S zu reduzieren, obwohl auch die SRB die Reduktion von Schwefel durchführen könnten. Die Habitate der S^0 -Reduzierer sind im Allgemeinen auch die der SRB [Reineke & Schlömann, 2007]. Zur Reduktion von elementarem Schwefel zu H_2S ist unter anderem *Desulfomonas acetoxidans* fähig. Weiterhin sind mehrere extrem thermophile und hyperthermophile Bakterien (Archaeobakterien), von denen die meisten acidophil und strikt anaerob sind, dazu in der Lage [Schlegel, 1992].

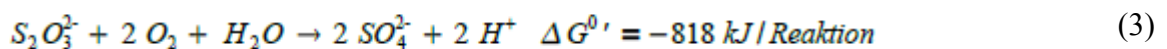
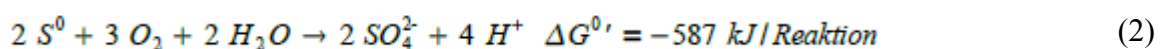
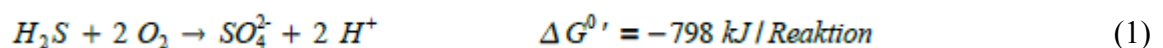
Die Oxidation von elementarem Schwefel wird am häufigsten von Vertretern der Gattung *Acidithiobacillus* durchgeführt. Schwefeloxidierende lithotrophe Prokaryonten sind jedoch phylogenetisch divers und können zu den Archaea und zu den Bakterien zugeordnet werden, siehe Tabelle 1 [Reineke & Schlömann, 2007].

Tabelle 1: Schwefeloxidierende Prokaryonten [Reineke & Schlömann, 2007]

Beschreibung	Vertreter
<i>Archaea</i>	<i>Sulfolobales</i>
lithotrophe Bakterien	<i>Acidithiobacillus</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Aquifex</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , <i>Starkeya</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Thermithiobacillus</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Xanthobacter</i>
phototrophe Bakterien	<i>Allochromatium</i> , <i>Chlorobium</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodovulum</i> , <i>Thiocapsa</i>

Reduzierter Schwefel wird aufgrund der oxidativen Wirkung der Atmosphäre in SO_2 und weiter in Schwefelsäure (H_2SO_4) umgewandelt [Reineke & Schlömann, 2007]. SO_2 wird bei pH-Werten unter 5 im Boden und Gewässern relativ leicht zu SO_4 oxidiert [Köhler & Völsgen, 1998].

Die Oxidation von Sulfid erfolgt bei neutralem pH-Wert schnell und spontan unter oxischen Bedingungen. Wenn jedoch anaerobe Bedingungen vorherrschen, wird H_2S durch chemolithoautotrophe Schwefeloxidierer in Sulfat überführt (Nitrat als Elektronenakzeptor). So verwenden Vertreter der *Thiobacillus*-Arten sowie *Gallionella ferruginea* und fädige Schwefelbakterien wie *Beggiatoa*, *Thiotrix* und *Thioploca* H_2S als Energiequelle. Zudem sind an der Reaktion das bipolar begeißelte *Spirillum* und das unbewegliche, thermophile Bakterium *Sulfolobus* beteiligt. Wobei die Energie aus der Reaktion unter anderem der CO_2 -Assimilation dient [Reineke & Schlömann, 2007]. Das Wirken der Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren ist in den Gleichungen 1 bis 3 dargestellt.

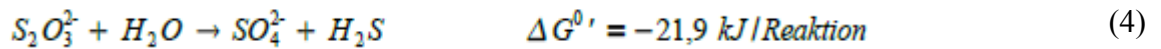


Nicht selten verursacht die Schwefelsäurebildung der Thiobacillen an Gebäuden und Kanalisationsrohren Korrosionsschäden [Fritsche, 1999].

Wenn Licht zur Verfügung steht, oxidieren phototrophe Bakterien H_2S unter anaroben Bedingungen. Schwefelpurpurbakterien benutzen H_2S oder $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ als externen Elektronendonator, wobei Schwefel in der Zelle in Form von Schwefelgranula abgelagert wird [Reineke & Schlömann, 2007].

Einige Prokaryonten sind zur Disproportionierung anorganischer Schwefelverbindungen fähig, unter anderem *D.sulfodismutans* [Fritsche, 1999]. Dieser Vorgang bezeichnet die

Spaltung von Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) in eine stärker oxidierte und eine stärker reduzierte Form als die ursprüngliche Verbindung [Reineke & Schlömann, 2007]. Dabei fungieren Thiosulfat oder Sulfit als Wasserstoffdonoren und -akzeptoren. Die Gleichung 4 stellt die Reaktion von Thiosulfat zu Sulfat und H_2S dar [Fritsche, 1999].



Schwefel liegt in lebenden Zellen als Mercaptogruppe in Form von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie Cystein, Methionin und Homocystein vor [Schlegel, 1992]. Der Abbau dieser Verbindungen erfolgt aerob zu Sulfat [Reineke & Schlömann, 2007]. Bei der anaeroben Zersetzung der organischen Substanzen werden die Mercaptogruppen durch Desulfurasen abgespalten, wobei H_2S gebildet wird. Dieser Vorgang wird auch als Desulfuration bezeichnet [Schlegel, 1992]. Der anaerobe Proteinabbau liefert ungefähr 5-10 % des H_2S , wobei die restlichen 90-95 % aus der dissimilatorischen Sulfatreduktion stammen [Schlegel, 1992].

1.3.1 Sulfatreduktion

Sulfatreduktion durch Mikroorganismen nimmt bei der Genese sedimentärer Schwefellagerstätten eine erhebliche Bedeutung ein [Köhler & Völsken, 1998]. Es werden zwei Arten der Sulfatreduktion unterschieden: die assimilatorische (ASR) und die dissimilatorische (DSR) Sulfatreduktion.

Bei der assimilatorischen Sulfatreduktion wird das Sulfat zur Synthese von schwefelhaltigen Zellkomponenten (Methionin und Cystein) genutzt. Diese Reaktion wird von Mikroorganismen und Pflanzen durchgeführt, Tiere und Menschen sind jedoch auf die Zufuhr von organischen Schwefelverbindungen angewiesen [Reineke & Schlömann, 2007].

Die dissimilatorische Sulfatreduktion wird ausschließlich von speziell angepassten Prokaryonten geleistet, dargestellt in Tabelle 2 [Cypionka, 2010]. Sulfidogene Bakterien werden auch als Desulfurikanten bezeichnet. Sie sind in der Lage, Wasserstoff auf Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor zu übertragen und Sulfat zu Sulfid zu reduzieren. An diesem Elektronentransport ist das Cytochrom c und b beteiligt. Dabei wird Energie durch Elektronentransportphosphorylierung unter anaeroben Bedingungen gewonnen. Die sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) sind obligat anaerobe Organismen und an streng anaerobe Bedingungen gebunden [Schlegel, 1992]. Eine große Bedeutung gewinnt die bakterielle Sulfatreduktion vor allem in marinen Sedimenten [Cypionka, 2010].

Tabelle 2: Phylogenetische Gruppen sulfatreduzierender Prokaryonten

Phyla	Vertreter	Beschreibung
<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Desulfobacter postgatei</i> ¹ , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ¹ , <i>Desulfosarcina</i> sp. ² , <i>Desulfobacterium</i> sp. ² , <i>Desulfococcus</i> sp. ² , <i>Desulfomonas</i> sp. ² , <i>Desulfobulbus</i> sp. ² , <i>Desulfonema</i> sp. ² , <i>Desulfomonile tiedjei</i> ¹²	gram-negative mesophile Bakterien
	<i>Desulfacinum infernum</i> ¹¹ , <i>Desulfacinum hydrothermale</i> ¹⁰	Thermophile Bakterien
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermodesulfobacterium commune</i> ³ , <i>Thermodesulforhabdus norvegica</i> ¹ , <i>Thermodesulfatator indicus</i> ² , <i>Thermodesulfobacterium thermophilum</i> ⁷	
<i>Nitrospirae</i>	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> ⁴	
<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> ¹ , <i>Desulfosporisinus orientis</i> ³ , <i>Thermodesulfobium narugense</i> ⁴ , <i>Desulfotomaculum geothermicum</i> ⁴ , <i>Desulfotomaculum kusnetsovii</i> ⁷ , <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ⁷	gram-positive Endosporenbildner
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> ⁹ , <i>Archaeoglobus veneficus</i> ¹ , <i>Archaeoglobus profundus</i> ⁸ , <i>Archaeoglobus lithotrophicus</i> ⁹	Thermophile Archaea
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Caldivirga maquilingensis</i> ⁶ , <i>Thermocodium modestius</i> ⁵	

[¹ Reineke & Schlömann, 2007; ² Schlegel, 1992; ³ Castro, 2000; ⁴ Mori *et al.*, 2003; ⁵ Itoh *et al.*, 1998; ⁶ Itoh *et al.*, 1999; ⁷ Henry *et al.*, 1994; ⁸ Burggraf *et al.*, 1990; ⁹ Stetter *et al.*, 1993; ¹⁰ Sievert & Kuever, 2000; ¹¹ Rees *et al.*, 1995; ¹² DeWeerd *et al.*, 1990]

Als Wasserstoff-Donor können einfache wenig komplexere Substratverbindungen, wie Lactat, Acetat, Propionat, Butyrat, Formiat, Methanol, Ethanol, höhere Fettsäuren, aromatische Verbindungen und elementarer Wasserstoff, dienen. Jedoch kann kein Bakterium alle diese Verbindungen verwerten und kein Substrat wird von allen Bakterien genutzt [Schlegel, 1992]. Die Oxidation dieser Substrate erfolgt teilweise unvollständig, so wandelt *Desulfovibrio desulfuricans* organische Substrate nur bis zu Acetat um und konserviert dabei ATP über die *Acetat-Kinase* [Cypionka, 2010]. Weitere unvollständige

Oxidierer sind *Desulfotomaculum nigrificans* und *Desulfobulbus propionicus*. Vollständige Oxidierer, wie *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfobacter postgatei*, *Desulfonema limicola* mineralisieren Acetat oder auch Benzoat und C₁-C₁₄-Fettsäuren weiter zu CO₂ und H₂O [Fritsche, 1999].

Die Sulfatreduktion wird in der Zelle durch eine Sulfataktivierung unter ATP-Verbrauch eingeleitet, wobei der Diphosphatrest des ATP durch eine *ATP-Sulfurylase* gegen Sulfat ausgetauscht wird. Das Diphosphat (PP_i) wird durch *Diphosphatase* gespalten. Durch diese Aktivierung entsteht APS, ein Anhydrid. In weiteren Schritten unterteilt sich die Reaktion in dissimilatorische (DSR) und assimilatorische Sulfatreduktion (ASR). Bei der DSR wird das aktivierte Sulfat (APS) durch *APS-Reduktase* (1) unter Bildung von AMP direkt zu Sulfit reduziert, wobei bei der ASR eine zweite Aktivierung stattfindet, indem das APS durch *APS-Kinase* und ATP zu Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) phosphoryliert wird. Anschließend wird das doppelt aktivierte Sulfat (PAPS) mittels *PAPS-Reduktase* (2) zunächst zu Sulfit, dann zu Sulfid reduziert. Die Sulfatreduktion ist in Abbildung 2 dargestellt.

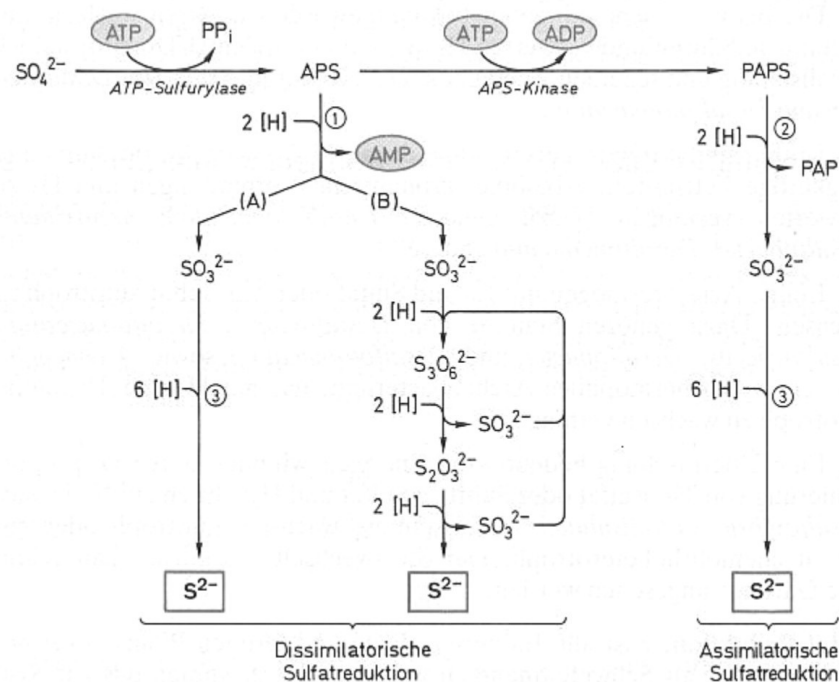
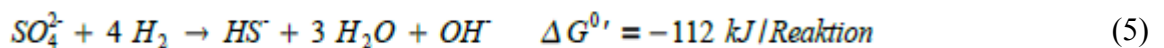


Abbildung 2: Sulfatreduktion [Schlegel, 1992]

Die Reduktion von Sulfit zu Sulfid verläuft bei verschiedenen Bakterien auf unterschiedlichen Wegen. Ein Weg (A) ist die direkte Reduktion von Sulfit mittels *Sulfit-Reduktase* (3), einem sehr komplex aufgebautes Sirohämprotein, durch einen sechsfachen Elektronentransfer ohne Bildung von Zwischenprodukten. An dieser Reaktion sind generell Eisenporphyrinverbindungen beteiligt. Beim zweiten Weg (B) wird Sulfit in drei

nacheinander folgenden Schritten reduziert, wobei freie Intermediärprodukte (Trithionat und Thiosulfat) auftreten [Schlegel, 1992]. Der Elektronentransport über Cytochrome (c- und b-Typ) führt zur Ausbildung eines Protonengradienten und zur ATP-Synthese durch die *ATP-Synthase* in einem modifizierten Tricarbonsäure-Zyklus oder Acetyl-CoA-Weg [Fritsche, 1999]. Durch die Sulfatreduktion intrazellulär gebildeter Schwefelwasserstoff liegt in der Zelle überwiegend als HS^- vor. Erst als H_2S kann es durch die Zellmembran diffundieren [Cypionka, 2010].

Einige untersuchte Arten der SRB besitzen eine konstitutive *Hydrogenase*, mit der H_2 sowohl aufgenommen, aktiviert als auch freigesetzt werden kann. Ein Großteil der SRB reduziert Sulfat mit H_2 und produziert dabei große Mengen H_2S ohne nennenswert zu wachsen [Schlegel, 1992]. Dieses chemolithoautotrophe Wachstum mit molekularem H_2 betreiben unter anderem *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum*. Sie verfügen ebenfalls über die Fähigkeit zur CO_2 -Assimilation über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg oder reduktiven Tricarbonsäure-Zyklus [Fritsche, 1999]. Gleichung 5 beschreibt die Sulfatreduktion unter autotrophen Bedingungen.



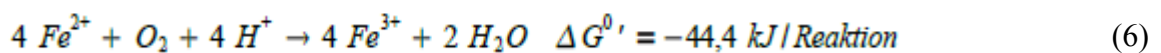
Bei der Sulfatreduktion werden insgesamt acht Elektronen durch die beiden cytoplasmatischen Enzyme aus der Atmungskette übernommen [Reineke & Schlömann, 2007]. Sulfat ist somit ein energetisch schlechter Elektronenakzeptor, da es vor der eigentlichen Reduktion unter ATP-Verbrauch aktiviert werden muss. Somit müssen große Mengen an Sulfat reduziert werden, bevor sich die Zellen verdoppeln können. Die Aufnahme von Sulfat in die Zelle geschieht bei der DSR über sekundäre Transportsysteme, die Sulfat zusammen mit Proteinen oder Natrium-Ionen transportieren [Cypionka, 2010].

Der Großteil des H_2S in der Umwelt wird entweder durch bakterielle Sulfatreduktion gebildet oder es stammt aus geochemischen Quellen (Sulfidquellen, Vulkanen). Bei pH-Werten unter 7 herrscht H_2S , andernfalls HS^- und S^{2-} vor [Reineke & Schlömann, 2007]. H_2S wirkt auf viele Organismen toxisch, was zum Absterben aerober Kulturen bei starker H_2S -Bildung führen kann [Fritsche, 1999]. Ein möglicher Entgiftungsmechanismus für Sulfid in der Umwelt ist seine Verbindung mit Eisen, was zur Bildung von unlöslichem FeS führt [Reineke & Schlömann, 2007]. Weiterhin wird bei der Sulfatreduktion neben Schwefelwasserstoff in größerem Umfang CO_2 gebildet, das überwiegend als Karbonat ausfällt [Köhler & Völsgen, 1998].

1.4 Eisenoxidation

Eisen ist eines der häufigsten Elemente der Erdkruste und ist Bestandteil zahlreicher Minerale und Gesteine. In der Natur kommt es hauptsächlich als Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Verbindungen vor, wobei elementares Eisen meist das Produkt menschlicher Aktivität ist. Bei pH-Werten von 1 bis 2 kommt es in Form von zwei- und dreiwertigen gelösten Ionen im Wasser vor. Bei höheren pH-Werten fällt Fe(III) zunehmend in Form von unlöslichen Hydroxiden aus ($\text{Fe}(\text{OH})_3$ oder FeOOH), dabei dominieren freie Fe^{2+} -Ionen gegenüber freien Fe^{3+} -Ionen [Reineke & Schlömann, 2007]. Obwohl es in Mikroorganismen in geringer Konzentration vorkommt, ist der Wechsel zwischen dem oxidierten Fe^{3+} und dem reduzierten Fe^{2+} an verschiedenen Reaktionen im mikrobiellen Energiestoffwechsel beteiligt. Diese Stoffwechselprozesse sind im Allgemeinen nicht mit einer Aufnahme von Eisen in die Zelle verbunden. Eisenionen können in Abhängigkeit von den jeweiligen Redoxbedingungen entweder als Elektronendonator oder -akzeptor genutzt werden [Köhler & Völsger, 1998].

Bei neutralem pH-Wert liegt eine sehr hohe Potentialdifferenz zwischen dem $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Paar und dem $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ -Paar vor. Deshalb oxidiert Fe(II) schon rein chemisch sehr schnell zu Fe(III), wenn höhere O_2 -Konzentrationen vorherrschen. Unter der Gleichung 6 ist die allgemeine chemolithotrophe Eisen(II)-Oxidation angegeben.



Unter anaeroben Bedingungen sind die Redoxpaare des Nitrat-Reduktionsweges günstigere Elektronenakzeptoren für die Fe^{2+} -Oxidation durch Denitrifikation. Weiterhin kann Fe^{2+} als Elektronendonator für die autotrophe CO_2 -Reduktion dienen. Im Neutralbereich werden Eisenkarbonate zu $\text{Fe}(\text{OH})_3$ oxidiert, dieses lagert sich extrazellulär in Form von Eisenoxid-Inkrustationen ab.

Bei niedrigen pH-Werten (< 4) bleibt Fe(II) gegenüber O_2 stabil und ist somit für Mikroorganismen verfügbar. Als Elektronenakzeptor dient O_2 aufgrund des sehr positiven Reduktionspotentials bei niedrigen pH-Werten. Dabei findet die Eisenoxidation an der Außenseite und die Reduktion des O_2 an der Innenseite der Membran statt. Das Cytoplasma besitzt einen neutralen pH-Wert von ungefähr 6 bis 7, während der pH-Wert des Außenmediums bei ungefähr 2 liegen kann. Die pH-Differenz über die Membran stellt einen natürlichen Protonengradienten dar, jedoch nur solange Fe(II) vorhanden ist. Der Protonengradient kann über die *ATP-Synthase* zur ATP-Bildung genutzt werden. Die Energieausbeute ist jedoch sehr gering, sodass große Mengen an Eisen oxidiert werden

müssen, damit die Zellen wachsen können [Reineke & Schlömann, 2007].

Bakterien, die Eisen(II) zu Eisen(III) oxidieren, kommen in Böden, Gesteinen und Erzen vor, die sulfidische Eisenverbindungen enthalten. Weiterhin lassen sich Eisenoxidierer in Gewässern und Drainagerohren, wie Moorgräben nachweisen [Fritsche, 1999]. Eine Zusammenstellung eisenoxidierender Prokaryonten befindet sich in Tabelle 3.

Die anaerobe Eisenoxidation stellt H_2 als Elektronendonator für den autotrophen Stoffwechsel autochthoner SRB bereit. Weiterhin werden OH^- -Ionen bereitgestellt, was die Stoffwechselaktivität der SRB weiter fördert. Zudem sind die Oberflächen des elementaren Eisens zur abiotischen Uranreduktion und Schadstoffsorption fähig [Kassahun *et al.*, 2010].

Tabelle 3: Phylogenetische Gruppen eisenoxidierender Prokaryonten

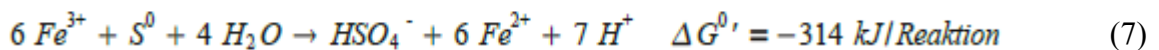
Phyla	Vertreter	Beschreibung
β -Proteobacteria	<i>Sphaerotilus natans</i> ¹	anaerob, organoheterotroph, neutrophil
	<i>Gallionella ferruginea</i> ¹ , <i>Leptothrix ochracea</i> ¹	aerob, chemolithotroph, neutrophil
	<i>Ferrovum myxofaciens</i> ¹⁷	aerob, chemolithotroph, acidophil
γ -Proteobacteria	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ¹	
Nitrospirae	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> ¹	
Firmicutes	<i>Sulfobacillus spp.</i> ¹	
Actinobacteria	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> ¹ , <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> ¹	
Crenarchaeota	<i>Sulfolobus metallicus</i> ¹	
Euryarchaeota	<i>Ferroplasma acidiphilum</i> ¹³ <i>Ferroglobus placidus</i> ¹	anaerobe, neutrophil, denitrifizierend
β -Proteobacteria	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ¹⁵	
δ -Proteobacteria	<i>Geobacter metallireducens</i> ¹⁷	
γ -Proteobacteria	<i>Thermomonas sp.</i> ¹⁷	anaerob, phototroph
	<i>Chromatium sp.</i> ¹²	
	<i>Thiodictyon sp.</i> ¹⁶	
α -Proteobacteria	<i>Rhodovulum robiginosum</i> ¹⁴ , <i>Rhodomicrobium vannielii</i> ¹²	
Chlorobi	<i>Chlorobium ferrooxidans</i> ¹	

[¹ Reineke & Schlömann, 2007; ¹² Heising & Schink, 1998; ¹³ Golyshina *et al.*, 2000; ¹⁴ Straub *et al.*, 1999; ¹⁵ Haaijer *et al.*, 2006; ¹⁶ Croal *et al.*, 2004; ¹⁷ Hedrich *et al.*, 2011]

Fe(III) dient für viele chemoorgano- und chemolithotrophe Prokaryonten als Elektronenakzeptor. Die Reduktion von Fe(III) findet in feuchten Böden, Sümpfen und

anoxischen Sedimenten von Seen statt, wo eine verwertbare organische C-Quelle bzw. H-Donor vorliegt, und führt zur Produktion von Fe(II), einer löslicheren Form. Unter anaeroben Bedingungen werden Fe³⁺-Oxide sowohl chemisch als auch mikrobiell reduziert. Eisenreduktion betreiben einige Vertreter der *δ-Proteobacteria*, wie *Geobacter*, *Geospirillum* und *Geovibrio*. Doch die Reaktion lässt sich auch bei *Shewanella putrefaciens* und *Pseudomonas aeruginosa*, Vertretern der *γ-Proteobacteria* und *Ferroglobus placidus*, einem hyperthermophilen Fe³⁺-Reduzierer aus dem Phylum *Euryarchaeota* nachweisen. Weiterhin sind einige Vertreter der *Arthrobacter* sp. aus dem Phylum der *Actinobacteria* dazu fähig [Reineke & Schlömann, 2007].

Des Weiteren sind Mikroorganismen nicht nur zur Oxidation von Fe²⁺, sondern auch zur Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen in der Lage. Diese Reaktion ist energetisch günstiger als die Fe²⁺-Oxidation, so können *Thiobacillus ferrooxidans* und *Thiobacillus thiooxidans* bei einem pH-Wert von 2 elementaren Schwefel oxidieren und Fe³⁺ reduzieren, siehe dazu die nachfolgende Gleichung 7.



Die Tätigkeit von Mikroorganismen beschleunigt die chemische Verwitterung von Mineralen in erheblichem Maße. Unter spezifischen Milieubedingungen können mikrobiell bewirkte Verwitterungsprozesse sogar dominieren. Dabei haben Eisenbakterien die Funktion der Regeneration der Fe³⁺-Ionen im Fe²⁺/Fe³⁺-Zyklus bei der Mineralauflösung [Köhler & Völsger, 1998].

1.5 Uranreduktion

Die Immobilisierung des schädlichen Urans in ehemaligen Bergbaugebieten hängt ganz entscheidend von der Überführung des relativ löslichen Uran(VI) in die unlösliche Form Uran(IV) ab. Uran(VI) ist aufgrund dieser Eigenschaft in der Umwelt viel mobiler und damit problematisch. Eine Uranreduktion durch anaerobe Bakterien führt zu einer dauerhaften Immobilisierung dieses Metalls. Wobei Mikroorganismen nicht nur die Reduktion des Urans katalysieren, sondern auch die Oxidation und beeinflussen somit seine Mobilität in der Umwelt.

Die bakterielle Oxidation des Uran(IV) zu Uran(VI) wird unter aeroben und sauren Milieubedingungen von eisen(II)- und schwefeloxidierenden Bakterien vorgenommen. Eisen(III) wird dabei als Elektronenakzeptor eingesetzt und so während der Uranoxidation reduziert. Es kann allerdings von acidophilen, eisenoxidierenden Bakterien, wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* regeneriert werden. Allerdings wirkt U(VI) auf viele Organismen toxisch und

inhibiert die Eisenoxidation.

Die bakterielle Uranreduktion dagegen führt zur dauerhaften Entfernung des Uran(VI) aus kontaminiertem Wasser. Wenn Sauerstoff als Elektronenakzeptor in tieferen Schichten verbraucht wurde, werden alternative Elektronenakzeptoren, wie NO_3^- , Mn(IV) , Fe(III) , SO_4^{2-} , CO_2 und schließlich U(VI) verwendet. Die einzelnen anaeroben Prozesse können allerdings parallel ablaufen, wenn sie thermodynamisch günstig sind. Bei hoher Nitratkonzentration läuft die Uranreduktion nicht ab, da sie energetisch nicht bevorzugt wird.

Für die Uranimmobilisierung ist somit die Eisen- sowie die Sulfatreduktion von besonderer Bedeutung. Die mikrobielle Uranreduktion durch Eisenreduzierer wurde an Vertretern der Gattungen *Geobacter* (*Geobacter metallireducens*) und *Shewanella* (*Shewanella putrefaciens*) am häufigsten untersucht. Diese Bakterien oxidieren Acetat (*Geobacter*) oder Wasserstoff (*Shewanella*) unter Verwendung des U(VI) als terminalen Elektronenakzeptor. Durch diesen Prozess fällt Uran in Form von unlöslichem Uran(IV)-Oxid (UO_2) aus.

Weiterhin wird die direkte enzymatische Uranreduktion durch sulfatreduzierende Bakterien, wie Vertreter der Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfotomaculum* durchgeführt. Dabei wird U(VI) infolge der Oxidation von Wasserstoff und organischen Säuren reduziert, wobei der Elektronentransport über ein c_3 -Cytochrom erfolgt. *Desulfotomaculum* ist zudem fähig zusätzlich zum Sulfat Eisen(III) als Elektronenakzeptor zu nutzen. Außerdem werden durch die dissimilatorische Sulfatreduktion große Mengen Sulfid für die indirekte abiotische Uranreduktion produziert. Mitglieder der Gattung *Desulfovibrio* eignen sich besonders zur biotischen Reinigung kontaminierter Wässer, weil sie hohe Konzentrationen von Uran und anderen toxischen Metallen tolerieren, Sauerstoff ausgesetzt werden können ohne ihre Aktivität zu verlieren und relativ leicht zu kultivieren sind.

Des Weiteren wurden thermophile Bakterien entdeckt, die ebenfalls zur U(VI) -Reduktion in der Lage sind. Dazu gehören ein *Thermus*-Isolat aus einer südafrikanischen Goldmine, das bei 60 °C mit Lactat als Substrat, und *Pyrobaculum islandicum*, das bei 100 °C mit Wasserstoff als Elektronendonator Uran reduziert. Jedoch nutzt keiner der beiden Organismen die Reaktion zum Wachstum. [Anderson & Lovley, 2002]

1.6 Fingerprinting und T-RFLP

Sequenzen codierend für Makromoleküle sind auch bei unterschiedlichen Organismen homolog und stammen folglich von einem gemeinsamen Vorfahren ab. Jedoch akkumulieren sich im Zeitverlauf durch auftretende Mutationen Sequenzunterschiede. Somit zeigt das Ausmaß der Sequenzähnlichkeit bei einer molekulargenetischen Diversitätsanalyse wie nah die jeweiligen Organismen miteinander verwandt sind.

Für diese Untersuchungen werden häufig die ribosomale RNA und DNA herangezogen, denn sie sind in den Zellen aller Lebewesen stets vorhanden. Zur Abgrenzung von prokaryontischen Lebensgemeinschaften wird die Analyse der ribosomalen DNA verwendet. Bei prokaryontischen Organismen verfügen die 70S-Ribosomen über eine große (5S-rRNA und 23S-rRNA) und eine kleine Untereinheit (16S-rRNA). Die 16S-rRNA ist an der Erkennung des Startpunktes eines Gens auf der mRNA beteiligt. Die 16S-rDNA ist als phylogenetisches Markermolekül für taxonomische und ökologische Untersuchungen besonders gut geeignet, da dieses Molekül universell verbreitet ist und in allen Organismen die gleiche Funktion erfüllt. Die Moleküle weisen Bereiche mit hoher Konservierung und geringer Variabilität auf. Diese liefern bei einem Sequenzvergleich Referenzpunkte, welche Bereiche bei immer etwas unterschiedlich langen Moleküle einander entsprechen. Weiterhin enthält das Molekül zudem weniger konservierte und eher variable Regionen, die Unterschiede zur Differenzierung zwischen verschiedenen Arten und Gattungen aufzeigen [Reineke & Schlömann, 2007]. Das erleichtert die Zuordnung von Sequenzen bei einem Vergleich. Zudem wurde von den verfügbaren bakteriellen ribosomalen Genen die 16S-rDNA gewählt, weil sie keinem horizontalen Gentransfer zwischen Organismen unterliegt, von ihr die meisten Sequenzdaten in Genbanken vorliegen und die technische Handhabung des mittellangen Moleküls (ca. 1500 bp) weniger problematisch ist.

Zu den gängigen Fingerprinting-Techniken gehören SSCP (single-strand-conformation-polymorphism/Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus), DGGE (denaturing-gradient-gel-electrophoresis/denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese), ARISA (automated-ribosomal-intergenic-spacer-analysis/automatisierte ribosomale intergenetische Raumanalyse) und RFLP (restriction-fragment-length-polymorphism/Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus). Die Methoden DGGE, SSCP und T-RFLP weisen nicht nur die Diversität nach, sondern auch Veränderungen in Populationen aufgrund von Stressfaktoren.

Die terminale RFLP-Methode basiert auf DNA-Polymorphismen, verschiedenen

Erscheinungsformen der Nucleotidsequenzen. Dazu erfolgt zunächst die Amplifikation der extrahierten Gesamt-DNA aus dem Boden oder Wasser mit einem PCR-Primer, der am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, gefolgt von einem Restriktionsverdau mit mehreren Enzymen, die spezifische Erkennungssequenzen (4 bp lang) aufweisen und die Sequenz häufig schneiden. Der letzte Schritt führt zur Erzeugung terminaler Restriktionsfragmente (T-RF) mit einer fluoreszierenden Markierung am 5'-Ende, die ein Signal bei der entsprechenden Länge liefern. Diese werden über Kapillarelektrophorese durch einen Sequenzer detektiert [Ottow, 2011]. Die Länge der terminalen Restriktionsfragmente kann genau bestimmt werden, da sie von der Sequenz und dem verwendeten Restriktionsenzym abhängt. Dabei wird bei der Methode nur die Länge eines Fragmentes und nicht das Bandenmuster analysiert [Reineke & Schlömann, 2007]. Ein Abgleich der Fragmente mit terminalen Restriktionsfragmenten aus vorhergehenden Analysen bekannter 16S-rDNA-Sequenzen ermöglicht eine phylogenetische Einordnung. Die T-RFLP-Analyse ist eine schnelle, empfindliche und reproduzierbare Methode zur Beurteilung der Vielfalt komplexer Lebensgemeinschaften ohne die Notwendigkeit einer aufwendigen Sequenzierung.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin mikrobielle Lebensgemeinschaften in verschiedenen Wasser- und Sedimentproben der gefluteten Grube Königstein und in Proben aus den dazugehörigen Technikumsversuchen nachzuweisen und zu identifizieren. Zusätzlich sollen die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Grube Königstein mit den Ergebnissen der Analysen des Flutungswassers der Gruben Pöhla und Schlema verglichen werden. Zu diesen Zwecken wird eine T-RFLP-Analyse aller Proben durchgeführt. Weiterhin wird eine umfangreiche Sequenzanalyse und anschließende phylogenetische Einordnung der hergestellten Klone der direkten Flutungswasserprobe aus der Uranerzgrube Königstein durchgeführt.

Die gewonnenen Informationen sollen zum besseren Verständnis der vorherrschenden Verhältnisse und Prozesse bei der Minimierung der Restschadstoffe in der ehemaligen Uranerzgrube Königstein helfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Proben

Die Bearbeitung aller Proben erfolgte im mikrobiologischen Labor der G.E.O.S. Ingenieurgesellschaft mbH. Die Wasserproben wurden im gefrorenen oder gekühlten Zustand übergeben. Weiterhin wurden Sedimentproben im gefrorenen Zustand angeliefert. Alle Proben werden in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4: Übersicht aller bearbeiteten Proben

Nr.	PN-Datum	Probe	Art der Probe	Konservierung
1	25.11.10	TV3-PS16	Porenwasser (ca. 100 ml)	Frost
2	08.12.10	TV2-PL6	Porenwasser (ca. 200 ml)	Frost
3	08.12.10	FluWa	Flutungswasser (2 x 1 L)	Frost
4	18.01.11	Ablauf-SS	Porenwasser (ca. 500 ml)	Frost
5	18.01.11	KMP2-SS	Porenwasser (ca. 500 ml)	Frost
6	02.02.11	k-8040	Flutungswasser untertage (2 x 1 L)	Kühlzelle
7	25.11.10	Cracker TV3-PS16	Reaktives Material aus Säulenversuch	Frost
8	25.11.10	Schlamm TV3-PS16	Eisenoxidschlamm aus Säulenversuch	Frost
9	10.12.10	P5-Schlamm	Grubenschlamm (1994)	Frost
10	19.01.11	Schlamm Einlauf SS	Eisenoxidschlamm aus Säulenversuch	Frost
11	23.08.11	F413	Flutungswasser Pöhla	/
12	23.08.11	F510P	Flutungswasser Schlema	/

2.1.2 Kits

Es wurden folgende Kits zur DNA-Extraktion, Aufreinigung und Klonierung verwendet:

- UltraClean™ Soil DNA Isolation Sample Kit
MO BIO Laboratories, Inc.
- Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices
Millipore GmbH
- StrataClone PCR Cloning Kit
Agilent Technologies, Inc.
- PowerWater® DNA Isolation Kit Sample
MO BIO Laboratories, Inc.

2.1.3 Chemikalien

Es wurden verschiedene Chemikalien der folgenden Firmen eingesetzt:

- LB-Agar (Luria/Miller) und LB-Medium (Luria/Miller)

Carl Roth GmbH & Co. KG

- Ampicillin Natriumsalz

Carl Roth GmbH & Co. KG

- X-Gal

Carl Roth GmbH & Co. KG

- N,N – Dimethylformamid (DMF)

Carl Roth GmbH & Co. KG

- TBE – Puffer

Merck KGaA

- Agarose

VWR International Ltd.

- Gelladepuffer

Carl Roth GmbH & Co. KG

- 1 kbp DNA-Leiter

Carl Roth GmbH & Co. KG

- Mastermix

eppendorf AG

- Primer 16S 1404r, 27f Cy5

eppendorf AG

- Primer 27f, T7, T3

biomers.net GmbH

- Dimethylsulfoxid (DMSO)

Carl Roth GmbH & Co. KG

- Enzyme AluI, HaeIII, HhaI

Fermentas GmbH

- Puffer Tango, Puffer R

Fermentas GmbH

- Genome Lab™ DNA Size Standard KIT – 600

Beckman Coulter GmbH

- Genome Lab™ Sample Loading Solution (SLS)

Beckman Coulter GmbH

- Mineral Oil
Beckman Coulter GmbH
- Genome Lab™ Separation Buffer
Beckman Coulter GmbH
- Genome Lab™ Separation Gel – LPAI
Charge Nr. M010549
Beckman Coulter GmbH
- Cellulosenitratfilter
Whatman GmbH
GE Water & Process Technologies GmbH

2.1.4 Geräte

Die Untersuchung der Proben erfolgte unter Verwendung folgender Geräte:

- Mastercycler® personal
eppendorf AG
- Elektrophoresekammer
Techne AG
- Stromversorgung E143
Consort
- Dunkelhaube DH – 30/32
Biostep® GmbH
- Zentrifuge Sigma 1-13
Merck KGaA
- Zentrifuge Rotina 35 R
Hettich Zentrifugen
- Filtrationseinheit
Nalgene®
- Vakuum Pumpen
Nalgene®
- Spectrophotometer ND – 1000
NanoDrop®
- CEQ™ 8000 Genetic Analysis System
Beckman Coulter GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbehandlung der Proben

Die Wasserproben 1 bis 3, 5 und 6, siehe Tabelle 4, wurden sofort nach der Übergabe durch einen sterilen Cellulosenitratfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Ø 47 mm) filtriert, um vorhandene Organismen aufzukonzentrieren. Danach wurden die Filter bei -20 °C aufbewahrt.

Probe 4 wurde zunächst in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, dann bei 11.000x g und Raumtemperatur 15 min zentrifugiert. Nach dem Entsorgen des Überstandes wurde die Probe erneut bei 13.000x g und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet als Sediment gehandelt und zur DNA-Extraktion verwendet.

Die Sedimentproben wurden vorbehandelt, um die Biomasse von anorganischen Bestandteilen wie Steine, Metall und Erde zu trennen. Dazu wurden jeweils ca. 5 g der Proben 8 bis 10 zunächst mit 50 mM Tris/HCl-Lösung versetzt. Probe 7 wurde in einem sterilen Mörser zermahlen, 2,74 g der Probe wurden anschließend mit 50 mM Tris/HCl-Lösung versetzt. Dann wurden die Proben in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 135 rpm und Raumtemperatur 30 min geschüttelt. Danach wurden die Probenröhrchen 5 min bei 8 °C und 2 000 rpm zentrifugiert um restliche anorganische Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und 15 min bei 8 °C und 11 000 rpm erneut zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde anschließend zur DNA-Extraktion eingesetzt.

2.2.2 DNA-Extraktion und PCR

Die DNA-Extraktion aller Proben erfolgte mit dem UltraClean™ Soil DNA Isolation Sample Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers. Proben 1 und 4, siehe Tabelle 4, wurden zusätzlich mit dem PowerWater® DNA Isolation Kit Sample entsprechend der Herstellerangaben behandelt.

Zur Amplifikation der extrahierten 16S rDNA wurde eine PCR mit den universellen Bakterienprimern 1404r und 27f Cy5 (fluoreszenzmarkiert) durchgeführt. Probe 6 (k-8040) wurde zudem mit den Primern ohne die Fluoreszenzmarkierung amplifiziert. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Sequenzen der Primer 27f und 1404r

Primer	Sequenz	Referenz
27f	5' – AGA GTT TGA TCC TGG GTC AG – 3'	Lane, 1991
1404r (1387r)	5' – GGG CGG WGT GTA CAA GGC – 3'	Marchesi <i>et al.</i> , 1998

Die extrahierte DNA der Sediment- und Wasserproben wurde zunächst 1:10, dann 1:100 verdünnt. Als Negativkontrolle wurde der Mix ohne DNA verwendet. Für alle Proben wurde ein Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 25 µl angefertigt. Die Proben 2 bis 10 wurden jeweils 3 mal amplifiziert. Dabei wurde bei Proben 2, 8 und 10 die 1:10 Verdünnung vervielfältigt. Bei der zusätzlichen PCR der Probe 6 (k-8040) mit dem Gesamtvolumen des Ansatzes von 50 µl wurde als Positivkontrolle der DNA-Extrakt vom 4.03.2011 verwendet. Es wurden verschiedene DNA-Volumina eingesetzt, 1 µl und 2 µl. Tabelle 6 enthält die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponente	Konzentration	Volumen in 50 µl Ansatz [µl]	Volumen in 25 µl Ansatz [µl]
Mastermix 2,5x	1x	20	10
Primer 27f 20 µM	0,5 µM	1,25	0,625
Primer 1404r 20 µM	0,5 µM	1,25	0,625
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3	1,5
dH ₂ O	-	23,5 (22,5)	11,25 (10,25)
DNA	-	1 (2)	1 (2)

PCR wurde gemäß Programm in Tabelle 7 ausgeführt.

Tabelle 7: Temperaturprogramm für die Amplifikation der 16S rDNA

Schritt	Zeitdauer	Temperatur [°C]	} 29 Wiederholungen der Schritte 2-4
1 Denaturierung	5 min	94	
2 Denaturierung	1 min	94	
3 Annealing	30 sec	55	
4 Elongation	1 min 30 sec	72	
5 finale Elongation	5 min	72	
6 Pause	-	15	

Zur Überprüfung der PCR sowie der DNA-Extraktion, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1 %iges (w/v) TBE-Agarose-Gel (2 g Agarose und 200 ml 1x TBE -Puffer) hergestellt. Das feste Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt, diese wurde dann mit 1x TBE -Puffer aufgefüllt. Die einzelnen Geltaschen wurden mit jeweils 5 µl PCR-Produkt versetzt mit 1 µl Gelladepuffer, bzw. mit 7 µl 1 kbp-DNA-Leiter (Marker) beladen. Es wurde eine Spannung von 120 V für 1 h 30 min angelegt. Anschließend erfolgte eine 3-minütige Färbung des Gels in einem Ethidiumbromidbad (2 mg/l). Nach ungefähr 30 min Entfärbung im Wasserbad wurde das Gel unter einer Dunkelhaube unter UV-Licht abfotografiert.

2.2.3 Aufreinigung und Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte der Proben wurden unter Verwendung von Filtereinheiten (Montage™) gemäß der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Es wurden jeweils 70 µl PCR-Produkt und 330 µl dH₂O in die Filtereinheiten gefüllt. Das PCR-Produkt enthielt die vereinten Produkte aus drei gleichen PCR-Reaktionen. Bei der zusätzlichen PCR der Probe 6 wurden jedoch 360 µl dH₂O und 40 µl PCR-Probe eingesetzt. Die Aufnahme des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgte statt in Wasser in einer Tris/dH₂O-Lösung (pH 7, Tris 20 mM). Außerdem wurde die erste Zentrifugation bei 1.500x g 25 Minuten durchgeführt, sodass die gesamte Flüssigkeit durchlaufen konnte.

Die Filtereinheiten wurden anschließend in 20 %igem Ethanol konserviert. Die aufgereinigten Produkte wurden zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt wie bereits beschrieben, der Rest wurde bei -20 °C eingefroren.

2.2.4 T-RFLP Analyse aller Proben

2.2.4.1 T-RFLP

Die T-RFLP Analyse wurde an der Technischen Universität Bergakademie Freiberg durchgeführt. Dazu wurden zunächst die DNA-Konzentrationen der aufgereinigten PCR-Produkte mit einem Spectrophotometer bestimmt, Tabelle 14. Für die T-RFLP Analyse wurde ein Restriktionsverdau der Proben mit den Enzymen AluI, HaeIII, HhaI und den entsprechenden Puffern angesetzt, siehe Tabelle 8. Diese Enzyme wurden ausgewählt, da sie bereits in vorangegangenen Untersuchungen verwendet wurden und somit schon vorhandene Fragmentbibliotheken genutzt werden können.

Tabelle 8: Erkennungssequenzen der Enzyme

Enzym	Quelle	Erkennungssequenz	Puffer
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'--- AG CT ---3' 3'--- TC GA ---5'	Tango
HaeIII	<i>Haemophilus egytius</i>	5'--- GG CC ---3' 3'--- CC GG ---5'	R
HhaI	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'--- GCG C ---3' 3'--- C GCG ---5'	Tango

Das Gesamtvolumen des Ansatzes von 10 µl setzte sich aus max. 8,9 µl aufgereinigten PCR-Produkten mit einer Konzentration von 100 ng/µl und 1,1 µl Puffer/Enzym-Mix (1 µl Puffer, 0,1 µl Enzym) zusammen.

Anschließend wurden alle Gemische über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurden jeweils zu 1,5 µl Enzym/PCR-Gemisch 28,5 µl SLS/Std-Gemisch (28,25 µl SLS, 0,25 µl Std) hinzugegeben. Dazu wurde noch ein Tropfen Öl hinzugefügt, um die Proben vor Verdunstung zu schützen. Die Vertiefungen der Pufferplatte wurden ungefähr zu $\frac{3}{4}$ mit Puffer gefüllt. Danach erfolgte die Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese.

2.2.4.2 Fragmentanalyse

Die Ergebnisse der T-RFLP werden in Form eines Elektropherogramms ausgegeben, welches ein Abbild der mikrobiellen Lebensgemeinschaft repräsentiert. Dabei werden die einzelnen Fluoreszenzsignale (Peaks) der geschnittenen terminalen Fragmente (T-RF) mit unterschiedlichen Peak-Höhen entsprechend der Fluoreszenzintensität angezeigt. Auf der X-Achse wird die Länge (Size) des Fragmentstückes (T-RF) in nt und auf der Y-Achse die relative Fluoreszenzintensität (Dye Signal) jedes Fragmentes dargestellt, Abbildung 3.

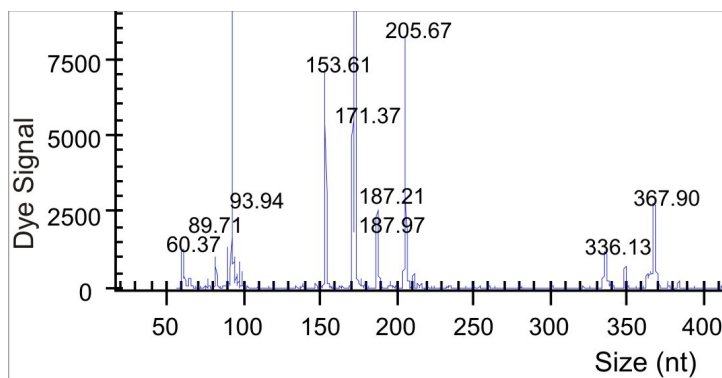


Abbildung 3: Ausschnitt eines Elektropherogramms

Die erhaltenen Ergebnisse der Fragmentdetektion wurden im Rahmen der Auswertung mit bereits an der TU Bergakademie Freiberg erstellten Fragmentbibliotheken aus vorangegangenen Analysen abgeglichen um Übereinstimmungen der detektierten T-RFs mit Fragmenten der Fragmentbibliotheken zu finden. Dabei werden T-RFs, die eine Länge um 2,5 nt größer oder kleiner als das Zielfragment besitzen, zusammengefasst. Auf diese Weise werden Messfehler des Sequenzierers berücksichtigt, wobei ein T-RF verschiedene Längen aufweisen kann. Dadurch konnten die T-RFs zu einigen Bakteriengruppen zugeordnet werden.

Da einige markante T-RFs nicht in der Fragmentbibliothek gefunden werden konnten, wurde eine zusätzliche Fragmentbibliothek erstellt. Dazu wurden nochmals die Daten aus bereits durchgeführten Untersuchungen mittels eines Webcutters mit den Enzymen AluI, HaeIII, HhaI bearbeitet [URL 5]. Die undefinierten Organismen wurden mit bereits hinterlegten Sequenzen der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank unter der Verwendung des Programms BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) verglichen [URL 5]. Zudem wurden die Sequenzen mit einer gleichen maximalen Identität mit dem Programm ClustalW2 aligniert [URL 6]. Die Cladogramme wurden nach der Neighbor-Joining-Methode berechnet.

2.2.4.3 Phylogenetische Analyse

Mit den identifizierten Bakterien in den Proben wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Dazu wurden die Sequenzen mit phylogenetisch verwandten Sequenzen unter Verwendung des Programms ARB abgeglichen. Als Basis diente die Sekundärstruktur der 16S-rRNA von *Escherichia coli* [Ludwig *et al.*, 2004; URL 7]. So wurde mit den Filtern Termini und Bacteria ein Dendrogramm nach der Maximum-Likelihood-Methode mit Bootstrap erstellt.

2.2.5 Sequenzierung der Probe k-8040

2.2.5.1 Ligation und Transformation

Im Rahmen der Analyse der Flutungswasserprobe k-8040 wurde das zu untersuchende DNA-Fragment, das zunächst extrahiert und durch die PCR amplifiziert wurde, in einen geeigneten Vektor ligiert. Anschließend wurde der Vektor kompetenten Zellen zur Transformation zugeführt. Für diese Zwecke wurde das StrataClone PCR Cloning Kit verwendet [Stratagene]. Die Durchführung der Ligation und Transformation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Zur Optimierung der Ligation wurde der

Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Weiterhin wurden 2 µl des Ligationsansatzes für die Transformation verwendet. Zudem wurde die Regenerationszeit der Zellen nach der Transformation auf 2 h erhöht.

Zur Blau-Weiß-Selektion der Klone wurden 2 x 10 µl, 2 x 20 µl, 1 x 50 µl der Transformationssuspension auf LB-Amp-Agar-Platten mit X-Gal ausplattiert, für die Zusammensetzung siehe Tabelle 9. Zusätzlich wurde der Rest der Suspension 1 min bei 13.000 xg zentrifugiert, Überstand größtenteils abgenommen und verworfen. Das entstandene Pellet wurde resuspendiert und komplett auf den LB-Amp-Agar mit X-Gal aufgetragen.

Tabelle 9: Zusammensetzung LB-Amp-Agar

Inhaltsstoff	Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	10 g/l
Agar – Agar	15 g/l
Ampicillin	100 µg/ml
pH – Wert 7,0 ± 0,2 mit NaOH	

Für die Ligation und Transformation wurde das aufgereinigte PCR-Produkt der Probe k-8040 pur, bei dem Einsatz von 1 µl extrahierter DNA verwendet.

2.2.5.2 Überimpfung der Klone

Die entstandenen Klone bei der Blau-Weiß-Selektion wurden auf neue LB-Amp-Agar mit X-Gal überführt. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Biomasse von dem jeweiligen Klon abgenommen und auf die neue Platte gegeben. Die aufgenommenen Klone wurden nummeriert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.5.3 Überprüfung der Klone

Nach der Inkubation der Klone über Nacht wurde der Einbau des PCR-Fragments in die Klone mittels einer PCR mit den Primern T7 und T3 kontrolliert. Die Größe des Fragments wurde anschließend mit einer Gelelektrophorese, wie bereits beschrieben, überprüft. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Primer T7 und T3 wurden von Stratagene speziell für die Sequenzierung von ligierten DNA-Fragmenten im bereitgestellten Vektor konstruiert.

Tabelle 10: Sequenzen der Primer T7 und T3

Primer	Sequenz	Referenz
T3	5' – CGC GCA ATT AAC CCT CAC TAA AG – 3'	Stratagene
T7	5' – GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AG – 3'	Stratagene

Es wurde jeweils in ein PCR-Ansatz etwas Biomasse von jedem Klon mit einem sterilen Zahnstocher gegeben. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 µl ist in Tabelle 11 enthalten.

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (20 µl)

Komponente	Konzentration	Volumen in Ansatz [µl]
Mastermix 2,5x	1x	8
Primer T7 20 µM	0,2 µM	0,2
Primer T3 20 µM	0,2 µM	0,2
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,2
dH ₂ O	-	10,4
DNA	-	-

Die PCR wurde gemäß Programm in Tabelle 12 ausgeführt.

Tabelle 12: Temperaturprogramm für die Amplifikation des Fragmentes mit den Primern T7/T3

Schritt	Zeitdauer	Temperatur [°C]	} 29 Wiederholungen der Schritte 2-4
1 Denaturierung	3 min	94	
2 Denaturierung	30 sec	94	
3 Annealing	30 sec	55	
4 Elongation	1 min 30 sec	72	
5 finale Elongation	5 min	72	
6 Pause	-	4	

2.2.5.4 Anlegen von Gefrierkulturen

Zunächst wurde LB-Flüssigmedium mit Ampicillin hergestellt und auf Reagenzgläser zu je 5 ml verteilt. Diese wurden anschließend jeweils mit einem Klon angeimpft. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 13 enthalten.

Tabelle 13: Zusammensetzung LB-Amp-Medium

Inhaltsstoff	Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	10 g/l
Ampicillin	100 µg/ml
pH – Wert $7,0 \pm 0,2$ mit NaOH	

Danach wurden die Flüssigkulturen bei 37 °C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension von jedem Klon mit DMSO zu 7 % versetzt und bei -20 °C eingefroren.

2.2.5.5 Sequenzierung der Klone

Zunächst wurden die Klone auf LB-Amp-Agar-Platten, siehe Tabelle 9, ausplattiert. Dann wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Klone von der Platte mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in das Stechagar der GATC Biotech AG gegeben. Die Platte mit dem Stechagar und den Klonen wurde zur Sequenzierung an GATC Biotech AG verschickt.

2.2.5.6 Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend unter der Verwendung der Tools PreGap und Gap4 bearbeitet [Staden, 1996]. Mit Hilfe der Tools konnten die einzelnen Chromatogramme angeschaut und bestimmte Abschnitte der Sequenzen, die eine sehr ungenaue Zuordnung der Basen enthielten, abgeschnitten werden. Abbildung 4 enthält einen Ausschnitt des Chromatogramms der Rohsequenz B09, wobei die vorderen Positionen der Sequenz dargestellt sind. Weiterhin ist im Chromatogramm die Zuversicht (confidence) der Zuordnung (Blaue Balken) der jeweiligen Basen angegeben. Die Werte schwanken stark und sind teilweise sehr gering.

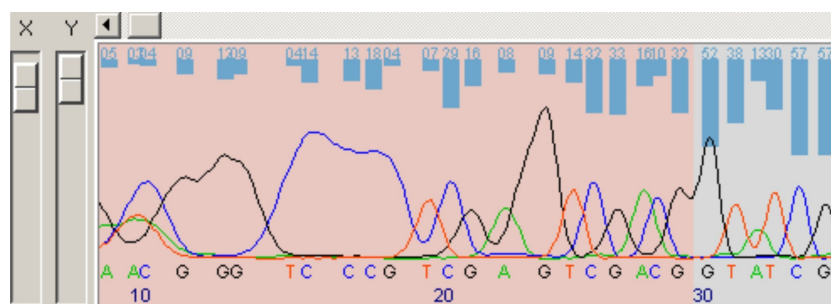


Abbildung 4: Ausschnitt eines Chromatogramms Positionen 8-35

In Abbildung 5 ist der hintere Abschnitt der Rohsequenz B09 dargestellt. Die Zuordnung der Basen ist ebenfalls sehr ungenau, da sich in vielen Abschnitten teilweise vollständige Überlappungen befinden. Dieser Teil musste ebenfalls entfernt werden.

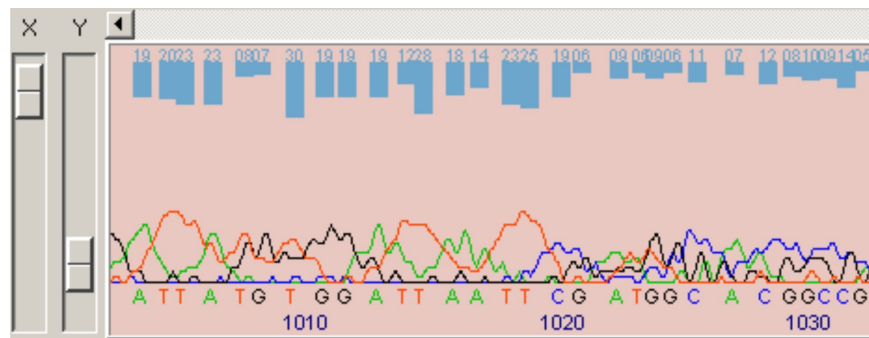


Abbildung 5: Ausschnitt eines Chromatogramms Positionen 1003-1033

Im Anschluß daran wurden die bearbeiteten Sequenzen mit bereits hinterlegten Sequenzen der NCBI Datenbank unter der Verwendung des Programms BLAST verglichen [URL 5]. Dann wurde wie bereits beschrieben ein phylogenetischer Baum unter der Verwendung des Programms ARB erstellt [Ludwig *et al.*, 2004; URL 7].

3 Ergebnisse

3.1 PCR und Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese nach der DNA-Extraktion und anschließender PCR bewies das Vorhandensein mikrobieller DNA, sowie erfolgreiche Amplifikation dieser, dargestellt in Abbildung 6 und Abbildung 7. Dabei zeigte Probe 1 (TV3-PS16) keine Bandenbildung, weder pur noch 1:10 verdünnt. Die restlichen Wasserproben ergaben mindestens eine starke Bande im Gel, nach mehrmaliger Extraktion und Amplifikation.

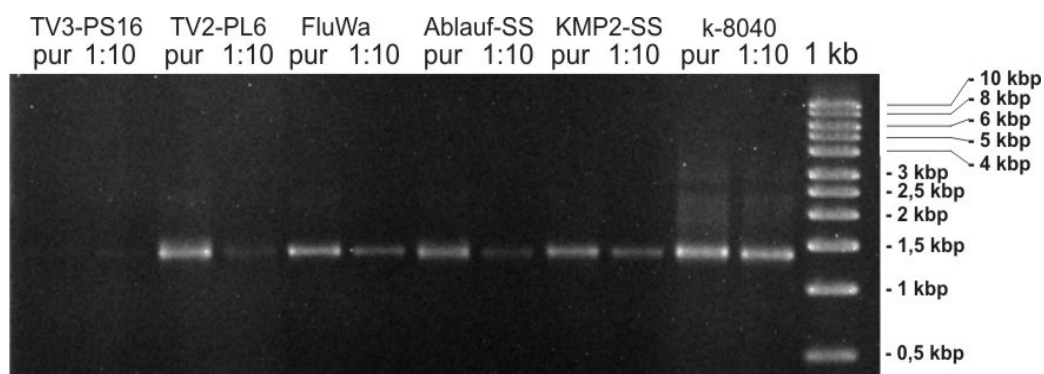


Abbildung 6: PCR Ergebnisse der Wasserproben

Probe 7 (Cracker TV3-PS16) zeigte nur schwache Banden im Gel. Bei Probe 8 (Schlamm TV3-PS16) ist eine Bande bei der 1:10 Verdünnung deutlicher zu erkennen. Die weiteren Proben kennzeichnen sich ebenfalls durch Bandenbildung.

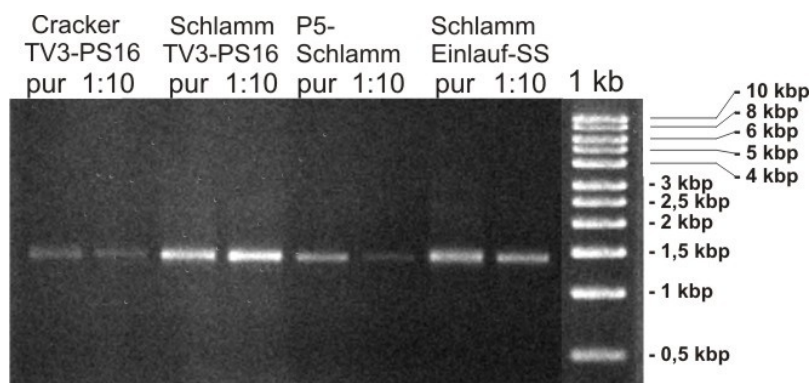


Abbildung 7: PCR Ergebnisse der Sedimentproben

In den Zusatzproben 11 (F413) und 12 (F510P) wurde ebenfalls mikrobielle DNA nachgewiesen. Die DNA-Extraktion und anschließende Amplifikation beider Proben führte zur Bandenbildung im Gel, sowohl bei der reinen Probe als auch der 1:10 Verdünnung, abgebildet in Abbildung 8.

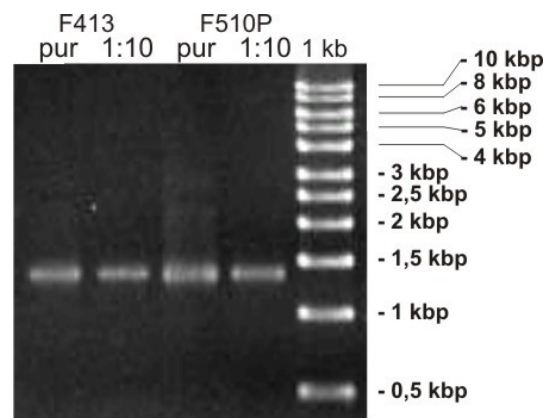


Abbildung 8: PCR Ergebnisse der
Zusatzprobe

Die erneute DNA-Extraktion und Amplifikation der Probe 6 (k-8040) wird in Abbildung 9 dargestellt. Der Einsatz von unterschiedlichen DNA-Volumina im PCR-Ansatz ergab, dass 1 μ l DNA für weitere Analysen durchaus ausreichend ist. Die Verdünnungen führten ebenfalls zu deutlichen Banden im Gel, außer der 1:100 Verdünnung bei 1 μ l DNA, was an zu geringem DNA-Gehalt liegt. Die negative Kontrolle zeigte wie erwartet keine Bande im Gel. Die positive Kontrolle, der DNA-Extrakt vom 4.03.2011, ergab bereits bei vorhergehenden Untersuchungen ein positives Ergebnis, wie auch in diesem Fall.

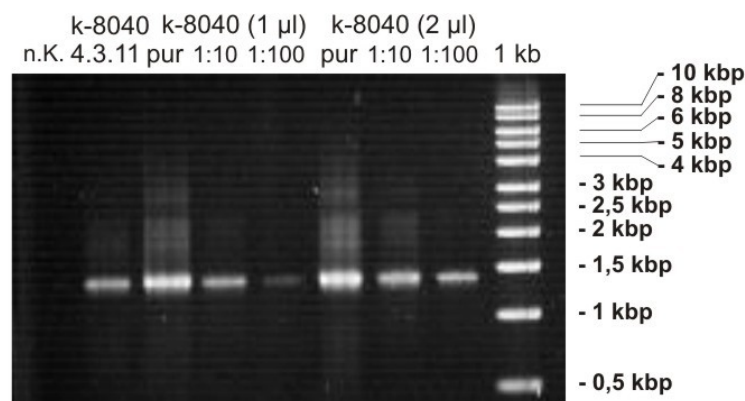


Abbildung 9: Ergebnisse der DNA-Extraktion und PCR der
Probe k-8040

3.2 T-RFLP-Analyse

3.2.1 DNA-Konzentration und Diversität

In Tabelle 14 sind die Proben aufgelistet, aus denen DNA erfolgreich extrahiert werden konnte. Zudem sind in der Tabelle die jeweiligen Konzentrationen der aufgereinigten PCR-

Produkte bestimmt mittels Spectrophotometer, mit enthalten.

Tabelle 14: DNA-Konzentrationen der Proben 2-12

Nr. Probe	Beschreibung	Konzentration der DNA [ng/μl]
2	TV2-PL6	68,6
3	FluWa	51,2
4	Ablauf-SS PW	70,0
5	KMP2-SS	42,9
6	k-8040	56,1
7	Cracker TV3-PS16	17,0
8	Schlamm TV3-PS16	10,7
9a	P5-Schlamm 9.03.2011	34,0
9b	P5-Schlamm 15.03.2011	43,0
10	Schlamm Einlauf SS	54,2
11	F413 Pöhla	34,7
12	F510P Schlema	57,9

Tabelle 15 enthält eine kurze Zusammenstellung der Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in den Proben 2-12. Die Diversität wird aus den erhaltenen Elektropherogrammen abgeleitet. Dabei wird die Diversität als gering bezeichnet, bei der die Peak – Anzahl der jeweiligen Elektropherogramme zwischen 1 und 9 liegt. Bei der mittleren Diversität liegt die Peak – Anzahl zwischen 10 und 25.

Tabelle 15: Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften

Nr. Probe	Bezeichnung	Diversität	
		gering	mittel
2	TV2-PL6	X	
3	FluWa	X	
4	Ablauf-SS	X	
5	KMP2-SS	X	
6	k-8040		X
7	Cracker TV3-PS16		X
8	Schlamm TV3-PS16		X
9	P5-Schlamm	X	
10	Schlamm Einlauf SS		X
11	F413 Pöhla		X
12	F510P Schlema		X

3.2.2 Phylogenetische Zuordnung

In Folge weiterer Auswertung der gewonnenen Daten wurden die Ergebnisse mit den Fragmentbibliotheken der TU Bergakademie Freiberg, siehe Anlage 2 abgeglichen. Tabelle 16 und Tabelle 17 enthalten einen Auszug aus Anlage 1, detektierte Bakteriengruppen in den Proben 2-10. Die hervorgehobenen bakteriellen Gruppen wurden mit mehreren Enzymen detektiert und sind daher eindeutig bestimmt.

Tabelle 16: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Wasser-Proben

Probe	Enzym			relative Häufigkeit [%]	Gruppe	Charakteristik
	AluI	HaeIII	HhaI			
TV2-PL6	/	/	92,73	30,9	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	64,39	/	/	37,2	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Stickstofffixierer
	/	/	60,97	33,9	<i>Rhizobium</i> sp.	Stickstofffixierer
FluWa	170,19	/	204,19	36,3	<i>Acidithiobacillus</i> sp.	Eisenoxidierer (autotroph)
Ablauf-SS	143,79	193,94	/	50,0	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	/	/	59,99	30,1	<i>Rhizobium</i> sp.	Stickstofffixierer
KMP2-SS	144,64	/	/	13,4	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	/	205,96	87,83	34,7	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	/	76,75	/	31,7	<i>Thiobacillus</i> sp.	Eisenoxidierer (autotroph)
	/	64,3	173,79	10,0	<i>Gloeobacter violaceus</i>	Cyanobakterien
	/	/	64,52	20,7	<i>Rhizobium</i> sp.	Stickstofffixierer
k-8040	/	252,69	205,55	14,3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Eisenoxidierer (autotroph)
	/	199,06	/	39,3	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	/	218,07	193,72	28,6	Alicyclobacillaceae	Aerobe Heterotrophe
	/	/	144,21	3,0	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Aerobe Heterotrophe

Die Auswahl beschränkt sich auf klar definierte Organismenspezies oder übergeordnete Bakterienfamilien, unkultivierte Bakterien sind in Anlage 1 aufgeführt.

Tabelle 17: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Sediment-Proben

Probe	Enzym			relative Häufigkeit [%]	Gruppe	Charakteristik
	AluI	HaeIII	HhaI			
Cracker TV3- PS16	144,05	/	340,25	7,4	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	169,81	/	/	27,9	<i>Ferrovum myxofaciens</i>	Eisenoxidierer (autotroph)
	242,65	/	/	25,7	<i>Actinobacterium</i> sp.	Aerobe Heterotrophe
	159,57	/	70,6	29,4	<i>Acidobacterium</i> sp.	Aerobe Heterotrophe
	/	/	144,89	6,0	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Aerobe Heterotrophe
	/	299,77	227,83	12,7	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	Aerobe Heterotrophe
Schlamm TV3- PS16	143,3	196,63	/	21,7	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	/	200,55	92,9	8,9	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	230,91	/	/	7,4	<i>Gallionella capsiferriformans</i>	Eisenoxidierer (autotroph)
	225,84	/	/	11,7	<i>Desulfatirhabdium butyrativorans</i>	Sulfatreduzierer (autotroph)
	/	/	60,73	6,3	<i>Rhizobium</i> sp.	Stickstofffixierer
	/	/	529,32	30,6	<i>Leptolinea tardivitalis</i>	Anaerobe Heterotrophe
	/	263,87	207,68	7,9	<i>Acinetobacter</i> sp.	Aerobe Heterotrophe
P5- Schlamm	143,69	/	/	71,8	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	/	200,23	/	9,8	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	171,06	/	/	8,5	<i>Ferrovum myxofaciens</i>	Eisenoxidierer (autotroph)
	63,79	/	/	4,7	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Stickstofffixierer
	63,98	/	/	6,7	<i>Gloeobacter violaceus</i>	Cyanobakterien
Schlamm Einlauf SS	72,36	259,55	/	13,2	<i>Acinetobacter</i> sp.	Aerobe Heterotrophe
	110,58	196,58	/	/	<i>Bosea thiooxidans</i> / <i>Mesorhizobium</i> sp.	Thiosulfatoxidierer / Stickstofffixierer
	64,24	/	/	7,1	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Stickstofffixierer
	/	/	141,44	2,7	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Aerobe Heterotrophe
	/	200,28	/	4,7	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	159,68	/	/	3,3	<i>Acidobacterium</i> sp.	Aerobe Heterotrophe

Die Gesamtheit der detektierten Bakterien in den Zusatzproben F413 und F510P wurde ebenfalls in Anlage 1 zusammengestellt. Ein Auszug befindet sich in Tabelle 18. Die relative Häufigkeit wurde aus der Peak – Fläche (rfuxmm) des jeweiligen Peaks im Elektropherogramm berechnet.

Tabelle 18: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Zusatzproben

Probe	Enzym			relative Häufigkeit [%]	Gruppe	Charakteristik
	AluI	HaeIII	HhaI			
F413 Pöhla	144,25	/	/	6,26	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	65,16	/	547,29	3,65	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Stickstofffixierer
	/	185,61	/	3,81	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Eisenoxidierer
	73,28	210,68	376,85	32,14	<i>Desulfotobacterium hafniense</i>	Schwefelreduzierer
	106,52	/	61,14	8,24	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Stickstofffixierer
	/	296,91	204,02	1,33	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	Aerobe Heterotrophe
F510P Schlema	72,42	253,8	/	7,6	<i>Acinetobacter</i> sp.	Aerobe Heterotrophe
	/	371,13	205,67	7,76	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Eisenoxidierer (Autotroph)
	234,4	75,36	367,9	11,91	<i>Thiobacillus</i> sp.	Eisenoxidierer (Autotroph)
	245	/	89,71	4,01	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Sulfatreduzierer
	203,9	262,02	/	13,39	<i>Solirubrobacter soli</i>	Aerobe Heterotrophe
	250,52	/	92,61	7,59	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	Sulfatreduzierer
	257,67	/	/	1,53	<i>Desulfotobacterium</i> sp.	Schwefelreduzierer
	/	/	60,37	2,08	<i>Rhizobium</i> sp.	Stickstofffixierer
	145,47	/	/	4,92	<i>Bosea thiooxidans</i>	Thiosulfatoxidierer
	/	287,73	/	2,61	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Stickstofffixierer

Der phylogenetische Baum ist in Abbildung 10 dargestellt. Um eine Wurzel zu setzen wurden zwei Vertreter des Stammes *Thermotogae* als Outgroup gewählt. An der Seite sind die zugehörigen Phyla jeder detektierten und definierten Bakterienspezies angegeben. Zusätzlich stehen Bootstrap – Werte an jeder Abzweigung.

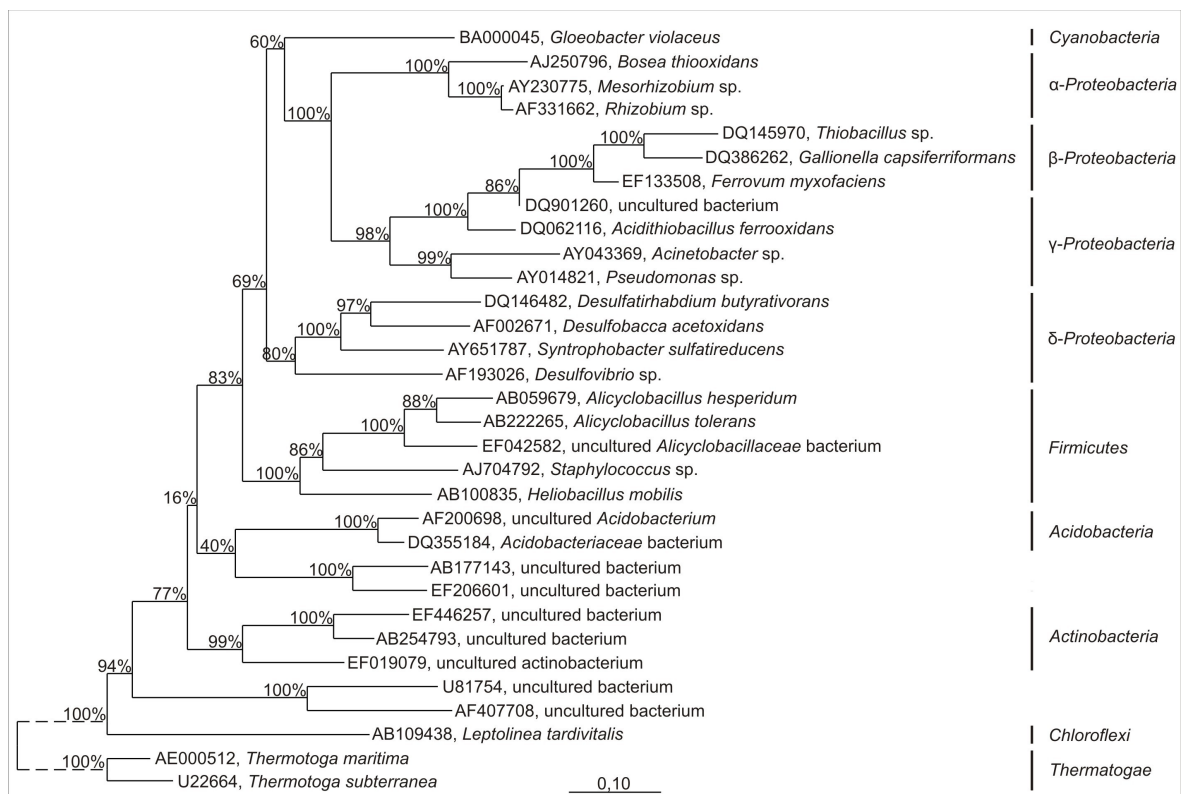


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum (Proben 2-10)

3.3 Sequenzierung der Probe k-8040

3.3.1 Klonierung

Nach der erfolgreichen Blau-Weiß-Selektion der Klone wurden die KBE ausgezählt und in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Ergebnisse der Auszählung

Ausplattiertes Volumen	Anzahl der KBE
10 µl	1 blaue und 2 weiße
10 µl	1 blaue und 19 weiße
20 µl	4 blaue und 25 weiße
20 µl	0 blaue und 15 weiße
50 µl	34 blaue und 165 weiße
Rest	unauszählbar

Nach der Inkubation der überimpften Klone auf neuen LB-Amp-Agar-Platten bildeten sich bei jedem Klon weiße Kolonien. Insgesamt wurden auf diese Weise 150 Klone für weitere Untersuchungen aufgenommen. Die anschließende Kontroll-PCR der Klone ergab, dass bei

fast jedem überprüften Klon ein DNA-Fragment mit einer Länge von ungefähr 1,6 kbp in den Vektor eingefügt wurde. Alle Gelbilder der dazugehörigen Gelelektrophorese befinden sich in Anlage 2.

3.3.2 Sequenzierung

Die erhaltenen und bearbeiteten Klonsequenzen wurden zu bestimmten Bakterienspezies zugeordnet, die gesamte Auflistung der BLAST-Ergebnisse ist in Anlage 5 hinterlegt. Insgesamt wurden 92 Klonsequenzen aufgenommen. Aufgrund häufiger Wiederholung einiger Individuen wurde eine Auswahl der Klonsequenzen getroffen, die sich relativ genau identifizieren ließen, siehe Anlage 4. In Abbildung 11 ist der phylogenetische Baum ausgewählter Klone dargestellt. Zu jedem identifizierten Phylum wurde zudem mindestens ein Vertreter hinzugefügt. Als Outgroup wurden erneut zwei Vertreter des Stammes *Thermotogae* ausgewählt. Es stehen Bootstrap – Werte an jeder Abzweigung. Die Klonsequenzen werden von Vertretern der Gattung *Ferrovum*, mit einer relativen Häufigkeit von 35 % und einer Übereinstimmung bis zu 100 %, sowie Vertretern der Gattung *Gallionella*, mit einer relativen Häufigkeit von 32 % und einer Übereinstimmung der Sequenzen bis zu 99 %, siehe Anlage 5.

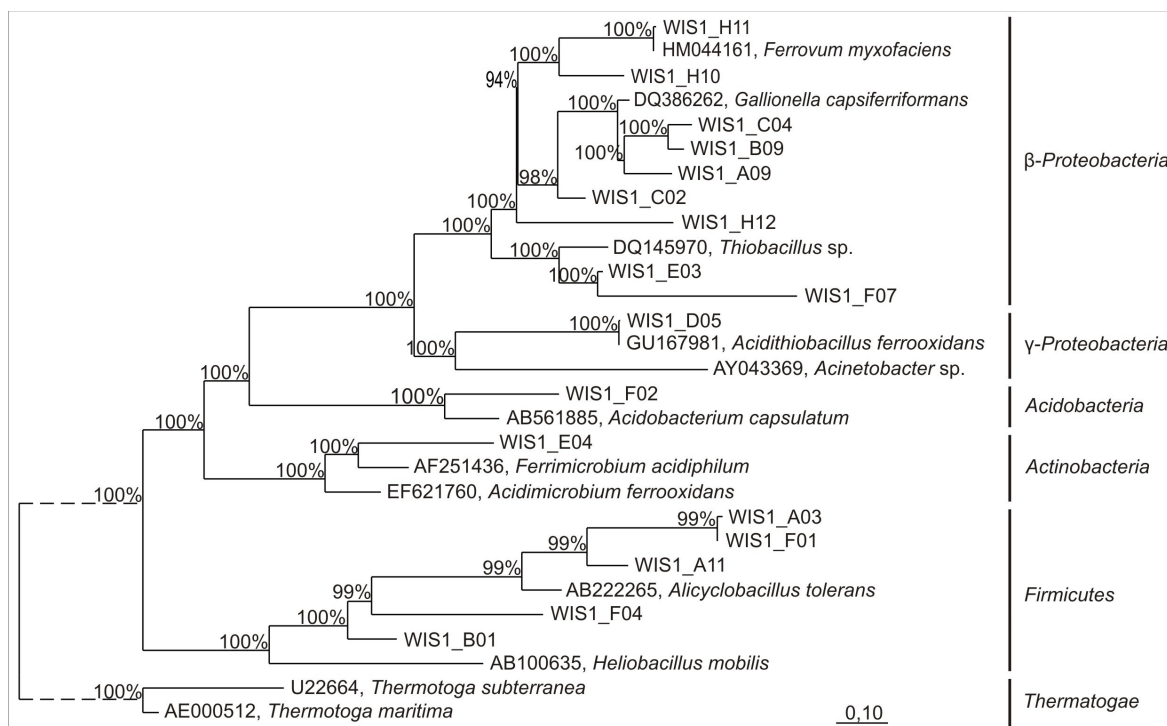


Abbildung 11: Phylogenetischer Baum ausgewählter Klone

4 Diskussion

Nach mehrmaliger Extraktion, Amplifikation und elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte konnte in allen Proben, bis auf Probe 1 (TV3-PS16), mikrobielle DNA nachgewiesen werden. Das Fehlen eines positiven Ergebnisses bei der ersten Probe könnte gegebenenfalls darauf zurückgeführt werden, dass mit 100 ml Probenvolumen einfach zu wenig Biomasse in der schon sehr klaren Probe für die DNA-Extraktion vorhanden war. Diese Annahme wird weiterhin dadurch bestätigt, dass die Probe 1 mit zwei unterschiedlichen Kits bearbeitet wurde, wobei beide zu keiner DNA-Extraktion geführt haben. Obwohl aus den dazugehörigen Sedimentproben 7 (Cracker TV3-PS16) und 8 (Schlamm TV3-PS16) genügend DNA für weitere Analysen extrahiert werden konnte, ist die Konzentration jedoch im Vergleich zu anderen untersuchten Proben relativ gering, siehe dazu Tabelle 14, Kapitel 3.2. Dies könnte gegebenenfalls dadurch erklärt werden, dass die Wasserproben zunächst filtriert oder zentrifugiert wurden um genügend Biomasse für weitere Analysen zu gewinnen. Dabei könnte eventuell die Ausbeute unzureichend gewesen sein. Weitere Störfaktoren, wie anorganische Ionen oder Steine in den Proben können die DNA-Extraktion negativ beeinflussen. Weiterhin könnte es sich um biofilmbildende Mikroorganismen handeln, die sich bevorzugt im Sediment oder Schlamm anreichern und damit weniger planktonische Zellen in den zugehörigen Wasserproben vorhanden sind.

4.1 T-RFLP-Analyse

Unter Verwendung der Elektropherogramme ließ sich die Diversität der Lebensgemeinschaften in den Proben ableiten, siehe Tabelle 15, Kapitel 3.2. Die jeweiligen Peaks stehen für ein terminales Fragment eines Bakterienstammes. Wobei die ersten Peaks des Elektropherogramms häufig die Primer abbilden. Je größer die Anzahl der Peaks desto höher die Diversität in der Probe. Es konnte jedoch in keiner der Proben eine hohe mikrobielle Diversität festgestellt werden. Diese bestätigen auch vorangegangene Ergebnisse der mikrobiellen Diversität in der ehemaligen Uranerzgrube Königstein. Die Untersuchungen ergaben, dass nur einige bestimmte, an die Standortbedingungen angepasste, Organismenspezies die Flutungs- und Grundwässer dominieren [Kassahun *et al.*, 2010]. Weiterhin lässt sich festhalten, dass in den Wasserproben 2-5 und Probe 9 (P5-Schlamm) eine geringere Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften nachgewiesen wurde, als in den Sedimentproben und Probe 6 (k-8040), siehe Tabelle 4, Kapitel 2.1.

Grund könnte das Anhaften der Zellen einiger Bakterienspezies an Sediment sein, was zu einer geringeren Diversität in den Wasserproben führt.

In den Proben wurden mittels Zuordnung der T-RFs allgemein autotrophe und heterotrophe Bakterien detektiert, was vermuten lässt, dass sowohl der autotrophe als auch der heterotrophe Stoffwechsel unter den gegebenen Milieubedingungen möglich ist. Es konnten Cyanobakterien, Stickstofffixierer und Thiosulfatoxidierer nachgewiesen werden. Eine vollständige Aufstellung der detektierten Mikroorganismen in den Proben 2-12 ist in Anlage 1 zu finden. Gemäß der T-RFLP-Analyse konnte die Vermutung über das Vorhandensein von sulfatreduzierenden und eisenoxidierenden Bakterien in den Proben zunächst bestätigt werden. Jedoch wurden viele Organismen nur mit einem der drei Restriktionsenzyme detektiert, was die Zuordnung zu einer Bakteriengruppe recht ungenau macht.

4.1.1 Phylogenetische Einordnung der Fragmente

Die detektierten Organismen in den Proben aus der Grube Königstein und den dazugehörigen Technikumsversuchen wurden weiterhin hinsichtlich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse untersucht. Zu diesen Zwecken wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, in dem die eindeutig definierten, aber auch die unkultivierten Organismen zusammengefasst sind, siehe Abbildung 10, kapitel 3.2. Einige unkultivierte Vertreter lassen sich somit zu bestimmten Phyla zuordnen. Als Grundlage wird dabei der Vergleich der Basensequenz der ribosomalen 16S-DNA verwendet. Innerhalb einer Art können jedoch über 97 % Übereinstimmung auftreten. Dennoch wird im phylogenetischen Baum ein evolutionärer Abstand der Spezies abgebildet. Die Verzweigungen in diesem Stammbaum haben allerdings keine zeitliche Dimension. Es wird angenommen, dass Veränderungen mit konstanter, kleiner Rate eingetreten sind [Cypionka, 2010]. Dabei liegen Organismen, deren Sequenzen ähnlich sind, im Baum näher beieinander. Starke Unterschiede in den Sequenzen führen zur weiteren Entfernung der Vertreter, was im Baum durch eine Auftrennung in einzelne Zweige verdeutlicht wird. Diese können in bestimmte Gruppen (Phyla) eingeteilt werden, so dass unter anderem Vertreter der Stämme *Firmicutes* oder *Actinobacteria* in eigene von einander abgetrennte Bereiche zusammengefasst werden können, siehe dazu Abbildung 12.

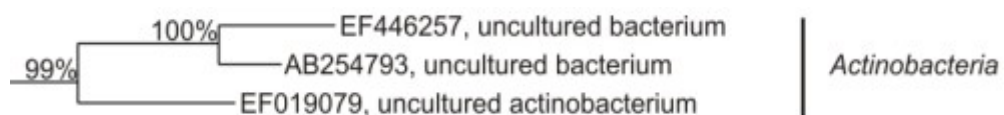


Abbildung 12: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Baum (Proben 2-10) I

Um die Genauigkeit des berechneten Baumes festzustellen wird ein Bootstrap – Wert jeder Verzweigung berechnet, wobei Werte über 70 % eine gute Unterstützung der Gruppierung der Organismenspezies durch die Daten anzeigen. In unserem Fall würde das auf die Aufteilung der α -, β - und γ -*Proteobacteria* zutreffen. Bei niedrigeren Werten wird die Gruppierung von den vorliegenden Daten nicht ausreichend unterstützt. Aufgrund dessen wurden zwei undefinierte Bakterien, deren BLAST-Ergebnisse ebenfalls keine Hinweise auf die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Phylum aufweisen, nicht zu den *Acidobacteria* zugeordnet. Ihr Stamm ist weiterhin unbekannt, weshalb auch kein Phylum an der Seite des Baumes aufgeführt wurde, siehe Abbildung 13.

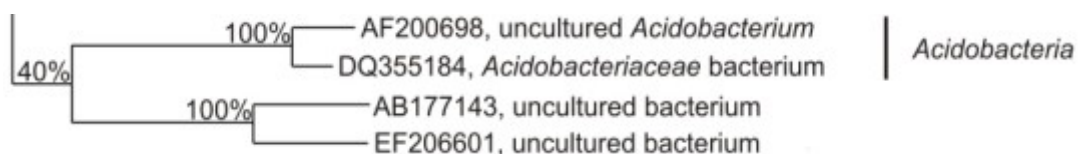


Abbildung 13: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Baum (Proben 2-10) II

Zwei weitere unkultivierte Bakterien konnten keinem benannten Phylum zugeordnet werden. Ihr Abstand zu den restlichen Vertretern der Stämme ist zu groß, was durch den relativ hohen Bootstrap – Wert an der Verzweigung unterstützt wird. Der Abgleich der Sequenzen mit den bei NCBI hinterlegten mittels BLAST führte ebenfalls zu keiner eindeutigen Zuordnung. Eine Auflistung der BLAST-Ergebnisse der identifizierten Sequenzen in den Proben 2-12 befindet sich in Anlage 4 des Praktikumsberichtes [Rommel, 2011].

4.1.2 Ökologie der Organismen verschiedener Standorte

Wenn das Genom aus Wasser sowie Boden extrahiert und isoliert wurde, ermöglicht die Analyse der DNA nicht nur die Charakterisierung der genetischen Diversität von Lebensgemeinschaften sondern auch einen Vergleich mit anderen Standorten [Ottow, 2011]. Somit wurden zusätzlich zu den Proben aus der Grube Königstein und den dazugehörigen Technikumsversuchen je eine Flutungswasserprobe aus den Gruben Pöhla und Schlema hinsichtlich ihrer mikrobiellen Lebensgemeinschaften untersucht. In beiden Proben konnten mittels T-RFLP eisenoxidierende und sulfatreduzierende, sowie thiosulfatoxidierende und stickstofffixierende Bakterien nachgewiesen werden, wobei die Detektion teilweise mit mehreren Restriktionsenzymen erfolgte. Jedoch konnten einige Fragmente nicht eindeutig zu bestimmten Bakterienspezies zugeordnet werden. Die gesamte Zusammenstellung aller detektierten Organismen ist in Anlage 1 aufgeführt.

Obwohl der Bergbau eingestellt und die Gruben zur Sanierung geflutet wurden, lassen sich immernoch für Bergbauwässer typische Lebensgemeinschaften von Bakterien feststellen. Trotz der Anhebung des pH-Wertes der sauren Grubenwässer wurden acidophile Organismenspezies wie *Ferrimicrobium acidiphilum* (Pöhla), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Schlema), *Alicyclobacillus sp.* (Königstein) gefunden. Dies deutet darauf, dass weiterhin Bedingungen für Stoffwechselvorgänge bei niedrigen pH-Werten bestehen. Des Weiteren bietet die Untersuchung der Grube Pöhla eine Erweiterung der bereits durch die T-RFLP identifizierten Bakterienspezies. So kommen zur phylogenetischen Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften des Standortes Pöhla ein weiterer Vertreter des Stammes *Actinobacteria*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, sowie *Desulfitobacterium hafniense* aus dem Phylum *Firmicutes* und *Desulfomonile tiedjei* aus der Klasse der δ -*Proteobacteria* hinzu, siehe dazu Anlage 1. Eine kurze Beschreibung und Einteilung dieser Organismen befinden sich in Tabelle 2, Kapitel 1.3, und Tabelle 3, Kapitel 1.4. Vertreter der Gattung *Desulfitobacterium* werden in sauren Wässern zusammen mit Angehörigen der sporenbildenden Gattung *Desulfosporosinus* detektiert. *Desulfitobacterium* ist in der Lage chlorierte Kohlenwasserstoffe, sowie Nitrat und Schwefelverbindungen (außer Sulfat) zu reduzieren [Köhler & Völsger, 1998]. Außerdem lebt es anaerob und mesophil, mit den Substraten Pyruvat und Tryptophan. Des Weiteren ist *Desulfitobacterium hafniense* zur Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) in Gegenwart von Pyruvat fähig [Christiansen & Ahring, 1996]. Die restlichen detektierten Bakterien sind bereits im phylogenetischen Baum in Abbildung 10, Kapitel 3.2, enthalten.

Die T-RFLP-Analyse des Flutungswassers aus der Grube Schlema führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Es wurden allerdings fast ausschließlich definierte Bakterienspezies identifiziert im Gegensatz zur Untersuchung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der Grube Pöhla. Zusätzlich wurde das aerobe Bodenbakterium *Solirubrobacter soli* aus dem Phylum *Actinobacteria* detektiert [Kim *et al.*, 2007]. Es sind sowohl autotrophe als auch heterotrophe Organismen nachweisbar. Zudem wurden in der Grube Schlema aber auch in den Proben aus der Grube Königstein mittels T-RFLP die obligat anaeroben Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* aus der Klasse der δ -*Proteobacteria* nachgewiesen. Sie reduzieren Schwefelverbindungen, wie Sulfat, Sulfit und Thiosulfat zu Schwefelwasserstoff (H_2S). Als Elektronendonatoren werden Lactat, Pyruvat, Ethanol oder bestimmte Fettsäuren verwendet. Diese gram-negativen Bakterien kommen in aquatischen Biotopen und nassen Böden mit einem hohen Anteil an organischen Substanzen vor [URL 10]. Weiterhin wurde in der Flutungswasserprobe der Grube Schlema das strikt anaerobe Bakterium

Heliobacillus mobilis aus dem Phylum *Firmicutes* nachgewiesen. Dieses ist zur anoxygenen Photosynthese und zur Stickstofffixierung fähig [Xiong *et al.*, 1998].

Die Zielreaktionen, wie die Sulfatreduktion, zur Immobilisierung von Restschadstoffen in den Gruben laufen anaerob ab. Sulfatreduzierende Bakterien gehören zu obligat anaeroben Organismen und sind an streng anaerobe Bedingungen gebunden [Schlegel, 1992]. Des Weiteren wird infolge der dissimilatorischen Sulfatreduktion in hohem Maße H_2S gebildet, welches auf viele Organismen toxisch wirkt und zum Absterben aerober Kulturen führen kann [Fritsche, 1999]. In der Grube Königstein wurde unter Verwendung der T-RFLP das anerobe sulfatreduzierende Bakterium *Desulfovibrio* nachgewiesen. Weitere anaerobe Bodenbakterien wurden in den dazugehörigen Technikumsversuchen identifiziert. Allerdings überwiegt die Zahl detektierter Eisenoxidierer und anderer aerober Bodenbakterien. Somit bestehen günstigere Verhältnisse für oxidierende Reaktionen. Obwohl in der Grube Pöhla sulfatreduzierende Bakterien, sowie anaerobe Bodenbakterien wie *Heliobacillus mobilis*, nachgewiesen wurden, kennzeichnen sich die restlichen detektierten Organismen jedoch überwiegend durch Wachstum unter aeroben Bedingungen. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass die dissimilatorische Sulfatreduktion in der Grube zwar weiterhin stattfindet, die Zahl der SRB aber zurückgegangen ist. In der Grube Schlemma wurden sowohl eisenoxidierende als auch sulfatreduzierende Bakterien mittels T-RFLP nachgewiesen. Somit wurden Hinweise auf sowohl aerobe als auch anaerobe Milieubedingungen geliefert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass beide Reaktionsprozesse, die dissimilatorische Sulfatreduktion und die autotrophe Eisenoxidation in der Grube ablaufen.

4.2 Sequenzanalyse

Unter der Verwendung der T-RFLP-Analyse können allerdings nur Mikroorganismen nachgewiesen werden, die bereits in die Fragmentbibliothek aufgenommen wurden, dessen Grundlage wiederum vorangegangene Untersuchungen gleicher oder ähnlicher Proben darstellt. Um weitere Mikroorganismen identifizieren und somit die bakterielle Lebensgemeinschaft um einige Individuen erweitern zu können, oder die bereits erhaltenen Ergebnisse der Untersuchung mit zusätzlichen Daten zu bestätigen, wurde eine aufwändigere molekulargenetische Methode durchgeführt. Die extrahierte bakterielle DNA aus der direkten Flutungswasserprobe k-8040 der ehemaligen Uranerzgrube Königstein wurde dabei in einen passenden Vektor ligiert und kompetenten Zellen zugeführt. Diese wurden anschließend einer sorgfältigen Selektion unterzogen. In Tabelle 19, Kapitel 3.3,

sind die Ergebnisse der Auszählung dargestellt, die Ausbeute an Klonen mit der Zielsequenz steigt mit zunehmendem ausplattierten Volumen der transformierten Zellen, sowie das Risiko der Bildung von Satellitenkolonien. Diese weisen selbst die gewünschte Eigenschaft nicht auf, profitieren aber von der Nähe transformierter Klone. Eine Überprüfung der ligierten Fragmentlänge führt zur gezielten Auswahl der Klone für eine Sequenzierung, siehe Anlage 2.

4.2.1 Phylogenetische Einordnung der Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu einer Gattung und somit einer Einordnung zu einem bekannten Phylum analysiert. Anlage 5 enthält die Ergebnisse aus dem Abgleich der Klonsequenzen mit den bei NCBI hinterlegten Sequenzen mittels BLAST. Aufgrund der Wiederholung einiger Organismenspezies wurden nur vereinzelte Klonsequenzen ausgewählt und in einen phylogenetischen Baum eingetragen, siehe Abbildung 11, Kapitel 3.3. Zu jedem identifizierten Phylum wurde zudem mindestens ein Vertreter hinzugefügt. Die Zuordnung mittels BLAST lässt sich somit bestätigen. Während Bakterien wie *Ferroplasma myxofaciens* aus dem Phylum β -Proteobacteria oder *Acidithiobacillus ferrooxidans* aus dem Phylum γ -Proteobacteria sich genau nachweisen lassen, konnten andere Klone, wie C04, B09 und A09 nur der Gattung, in diesem Fall *Gallionella* zugeordnet werden, siehe dazu Abbildung 14.

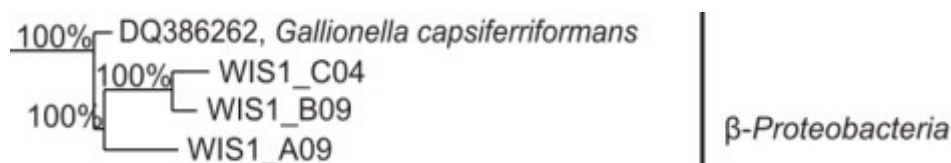


Abbildung 14: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Baum ausgewählter Klone

Eine genauere Identifizierung einzelner Klone gestaltet sich jedoch überwiegend schwierig, da aufgrund des Sequenzierungsvorgangs unvermeidliche Fehlzuordnungen der Basen auftreten. Zudem wurde die Klonsequenz nur mit einem Primer ansequenziert, sodass ein komplementärer Strang zu Vergleich fehlt. Obwohl die maximale Identität der verglichenen Sequenzen mittels BLAST durch die Bearbeitung der Klonsequenzen erhöht wurde, lassen sich leichte Abweichungen nur verringern doch nicht gänzlich vermeiden. Damit wurden zahlreiche Klone nur im phylogenetischen Baum aufgeführten Phyla zugeordnet. Auf weitere Phyla und Klone wurde in der Abbildung verzichtet, weil die dargestellten Klone gemäß ihrem Unterschied ausgewählt wurden, so würden Vertreter zusätzlicher Phyla im Baum abseits stehen und weitere Klone sich an den einzelnen Enden

ansammeln. Des Weiteren wurden mehrere unkultivierten und undefinierten Bakterien nachgewiesen, weshalb lediglich auf Phyla geschlossen werden kann, wie unter anderem bei *Actinobacteria* oder *Firmicutes*. Die Robustheit der phylogenetischen Konstruktion wird durch die Bootstrap–Werte an jeder Verzweigung angegeben. Im Falle des Baums in Abbildung 11 aus Kapitel 3.3 sind alle Werte sehr hoch, was beweist, dass die Gruppierung der Sequenzen durch die Daten ausgezeichnet unterstützt wird.

Wenn die Ergebnisse der vorangegangenen T-RFLP-Analyse der Flutungswasserprobe aus der Grube Königstein zum Vergleich hinzugezogen werden, werden gewisse Unterschiede festgestellt. In Abbildung 15 sind alle durch die T-RFLP detektierten Organismen in einem phylogenetischen Baum mit Bootstraps–Werten zusammengestellt.

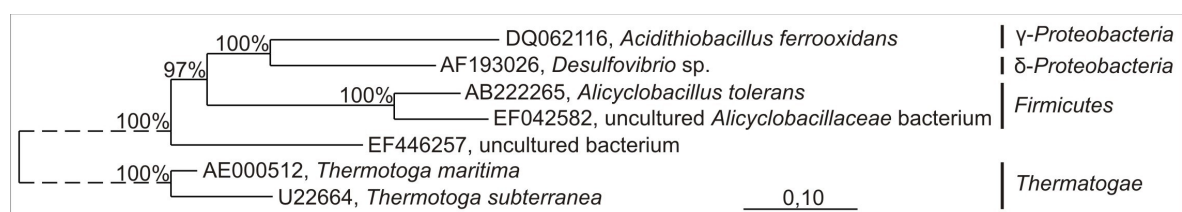


Abbildung 15: Phylogenetischer Baum (Probe k-8040)

Beide Untersuchungen der Probe führen zum Nachweis von *Alicyclobacillus* sp. und *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Durch die direkte Sequenzanalyse selbst hergestellter Klone wurden jedoch Vertreter der Phyla *Acidobacteria* und *Actinobacteria* der bestimmten mikrobiellen Lebensgemeinschaft hinzugefügt. Allerdings fehlt *Desulfovibrio* sp., sowie Hinweise auf andere SRB aus dem Phylum der *δ-Proteobacteria* gänzlich.

4.2.2 Standort Königstein

Die Sequenzanalyse ergab im Allgemeinen, dass die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Flutungswassers der Grube Königstein durch eisenoxidierende Bakterien aus dem Phylum *β-Proteobacteria* dominiert wird. Bei den Vertretern handelt es sich hauptsächlich um *Gallionella* sp. und *Ferrovum myxofaciens*. Eine kurze Beschreibung und Einteilung dieser Organismen befindet sich in Tabelle 3, Kapitel 1.4. Das acidophile Bakterium *Ferrovum myxofaciens* wurde noch keiner Ordnung oder Familie zugeordnet. Es ist weit verbreitet in sauren, eisenreichen Bächen und Flüssen, wo häufig makroskopisches Wachstum beobachtet wird [Hedrich *et al.*, 2011]. *Ferrovum myxofaciens* oxidiert nur Eisen(II), ist obligat aerob und scheint für saure Bergbauwässer typisch zu sein. Weiterhin werden in der Lebensgemeinschaft häufig *β-Proteobakterien* nachgewiesen, die mit *Gallionella* verwandt sind [Heinzel *et al.*, 2009]. Weitere bekannte acidophile Eisenoxidierer wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* scheinen dagegen keine bedeutende Rolle zu spielen, denn

sie treten nur mit einer sehr geringen Häufigkeit auf. In Abbildung 16 ist die Häufigkeitsverteilung der Bakterienstämme untersuchter Klone.

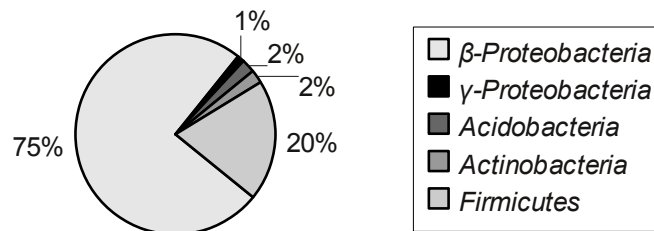


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Bakterienstämme anhand der analysierten Klone der Probe k-8040

Vertreter aus dem Phylum *Firmicutes* bilden die nächstgrößere Gruppe und gehören überwiegend zum Genus *Alicyclobacillus*. Diese heterotrophen Bakterien sind strikt aerob und wachsen unter acidophilen Verhältnissen.

Somit lässt sich schlußfolgern, dass größtenteils saure und aerobe Milieubedingungen in der Grube vorliegen, diese bieten zwar optimale Wachstumsvoraussetzungen für viele eisenoxidierende Bakterien, jedoch keine günstigen Bedingungen für SRB. Des Weiteren deutet das Vorhandensein von überwiegend eisenoxidierenden Bakterien auf oxidierende Verhältnisse im Flutungswasser der Grube hin. Die Zielprozesse zur Schadstoffimmobilisierung sind jedoch reduktive Vorgänge, wie die Sulfat- und Uranreduktion. Das Fehlen von Hinweisen auf diese Reaktionen führt zu der Annahme, dass Restschadstoffe wie Uran, Arsen und Schwermetallen weiter oxidiert und somit mobilisiert werden.

5 Zusammenfassung

Nach einer aktiven Sanierung von ehemaligen Bergbaugebieten besteht weiterhin das Risiko von Restschäden durch kontaminiertes Flutungswasser der Gruben. So gelangen Schadstoffe, wie Uran, Arsen und Schwermetalle, in die Umgebung der ehemaligen Uranerzgrube Königstein. Eine Immobilisierung dieser Stoffe wird unter anderem durch den Einsatz von sulfatreduzierenden Mikroorganismen erreicht.

In der Arbeit wird die Untersuchung verschiedener Wasser- und Sedimentproben der Grube Königstein, der dazugehörigen Technikumsversuche, der Grube Pöhla und Schlema auf mikrobielle Lebensgemeinschaften behandelt. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden und anschließender Auswertung der erhaltenen Daten wurde eine Identifizierung der Organismengruppen sowie Feststellung der Diversität vorgenommen.

Unter der Verwendung der T-RFLP-Methode gelang es in der Flutungswasserprobe der Grube Pöhla und Schlema sulfatreduzierende und eisenoxidierende Bakterien, sowie weitere Bodenbakterien nachzuweisen. Diese Organismen wurden in den Proben der Grube Königstein ebenfalls detektiert. Allerdings konnte durch eine Sequenzanalyse selbst hergestellter Klone das Vorhandensein von Sulfatreduzieren nicht bestätigt werden. Die Untersuchung ergab vielmehr, dass die mikrobielle Lebensgemeinschaft stark von eisenoxidierenden Bakterien wie *Ferrovum myxofaciens* dominiert wird.

Des Weiteren deuten Hinweise auf saure und aerobe Bedingungen darauf hin, dass Zielprozesse, wie die dissimilatorische Sulfatreduktion in den Gruben abgenommen haben und die Zahl anaerober Bakterien, darunter sulfatreduzierender Bakterien, zurückgegangen ist. Das Vorhandensein von überwiegend eisenoxidierenden Bakterien in der Grube Königstein weist außerdem auf oxidierende Verhältnisse im Flutungswasser der Grube hin.

6 Literaturverzeichnis

- Anderson, R. T. & Lovley, D. R., Microbial redox interactions with uranium: an environmental perspective. In: Keith-Roach, M. J. & Livens, F. R. (Hrsg.): Interactions of microorganisms with radionuclides, Elsevier Science Ltd., Amsterdam, S. 205–223, 2002
- Burggraf, S., Jannasch, H. W., Nicolaus, B. & Stetter, K. O. (1990) *Archaeoglobus profundus* sp. nov. Represents a new species within the sulfate-reducing Archaeobacteria. Systematic and Applied Microbiology. 13:24–28.
- Castro, H. F., Williams, N. H. & Ogram, A. (2000) Phylogeny of sulfate reducing bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 31:1–9.
- Christiansen, N. & Ahring, B. K. (1996) *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an Anaerobic, Reductively Dechlorinating Bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology. 46:442–448.
- Croal, L. R., Johnson, C. M., Beard, B. L. & Newman, D. K. (2004) Iron isotope fraction by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. Geochimica et Cosmochimica Acta. 68:1227–1242.
- Cypionka, H., Grundlagen der Mikrobiologie, 4. überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 2010
- DeWeerd, K. A., Mandelco, L., Tanner, R. S., Woese, C. R. & Suflita, J. M. (1990) *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenatic, sulfate-reducing bacterium. Archives of Microbiology. 154:23–30.
- Fritsche, W., Mikrobiologie, 2. überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999
- Golyshina, O. V., Pivovarova, T. A., Karavaiko, G. I., Kondrat'eva, T. F., Moore, E. R. B., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., Timmis, K. N., Yakimov, M. M. & Golyshin, P. N. (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-

oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50:997–1006.

Haaijer, S. C. M., Van der Welle, M. E. W., Schmid, M. C., Lamers, L. P. M., Jetten, M. S. M. & Op den Camp, H. J. M. (2006) Evidence for the involvement of betaproteobacterial *Thiobacilli* in the nitrate-dependent oxidation of iron sulfide minerals. FEMS Microbiology Ecology. 58: 439–448.

Hedrich, S., Schlömann, M. & Johnson, D. B. (2011) The iron-oxidizing proteobacteria. Microbiology. 157:1551–1564.

Heinzel, E., Hedrich, S., Janneck, E., Glombitza, F., Seifert, J., & Schlömann, M. (2009) Bacterial Diversity in a Mine Water Treatment Plant. Applied and environmental microbiology. 75:858–861.

Heising, S. & Schink, B. (1998) Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodornicrobiurn vanniellii* strain. Microbiology. 144:2263–2269.

Henry, E. A., Devereux, R., Maki, J. S., Gilmour, C. C., Woese, C. R., Mandelco, L., Schauder, R., Remsen, C. C. & Mitchell, R. (1994) Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. Archives of Microbiology. 161:62–69.

Itoh, T., Suzuki, K. & Nakase, T. (1998) *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. International Journal of Systematic Bacteriology. 48:879–887.

Itoh, T., Suzuki, K. & Nakase, T. (1999) *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. International Journal of Systematic Bacteriology. 49:1157–1163.

Kassahun, A., Hoffmann, M., Richter, M., Uhlig, U., Schlussbericht: Nachhaltige

Minimierung des langzeitlichen Stoffaustrags aus unterirdischen anorganischen Schadensherden am Beispiel der gefluteten Uranerzgrube Königstein, GFI Grundwasserforschungsinstitut GmbH, Dresden, 2010.

Kim, M. K., Na, J. R., Lee, T. H., Im, W. T., Soung, N. K. & Yang, D. C. (2007) *Solirubrobacter soli* sp. nov., isolated from soil of aginseng field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57:1453–1455.

Köhler, M. & Völsken, F.; Geomikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen, WILEY VCH Verlag, Weinheim, 1998

Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Hrsg.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, S. 115-175, 1991.

Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A. W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüßmann R., May, M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A. & Schleifer K. H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Research. 32 (4):1363–71.

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, A. J. & Wade, W. G. (1998) Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 64:795–799.

Mori, K., Kim, H., Hakegawa, T. & Hanada, S. (2003) A novel Lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. Extremophiles. 7:283-290

Ottow, J. C. G., Mikrobiologie von Böden: Biodiversität, Ökophysiologie, Metagenomik, Springer Verlag, Berlin, 2011

- Rees, G. N., Grassia, G. S., Sheehy, A. J., Dwivedi, P. P. & Patel, B. K. C. (1995) *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a Thermophilic Sulfate-Reducing Bacterium from a Petroleum Reservoir. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:85–89.
- Reineke, W. & Schlömann, M., *Umweltmikrobiologie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2007
- Rommel, L. (2011) Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften mittels T-RFLP-Analyse ausgewählter Wasser- und Sedimentproben der gefluteten Uranerzgrube Königstein. Hochschule Mittweida (FH), Praktikumsbericht
- Schlegel, H.G., *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1992
- Sievert, S. M. & Kuever, J. (2000) *Desulfacinum hydrothermale* sp. Nov., a thermophilic, sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:1239-1246.
- Staden, R. (1996) The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5: 233-41.
- Stetter, K. O., Huber, R., Blöchl, E., Kurr, M., Eden, R. D., Fielder, M., Cash, H. & Vance, I. (1993) Hyperthermophilic Archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*. 365:743–745.
- Stratagene (2002) BL21 (DE3) competent cells. BL21 (DE3) pLys competent cells and BL21 competent cells. Instruction manual
- Straub, K. L., Rainey, F. A. & Widdell, F. (1999) *Rhodovulum iodosurn* sp. nov. and *Rhodovulum robiginosurn* sp. nov., two new marine phototrophic ferrous-iron-oxidizing purple bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:729–735.
- Xiong, J., Inoue, K. & Bauer, C. E. (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis

by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 95:4851–14856.

[URL 1]

Verfasser unbekannt, Sanierung und Flutung der Gruben Königstein und Dresden-Gittersee, URL: http://www.wismut.de/de/nl-koenigstein_flutung.php, verfügbar am 14.06.2011

[URL 2]

Verfasser unbekannt, Flutung der Grube Königstein, URL: <http://www.medienservice.sachsen.de/medien/news/137689>, verfügbar am 16.06.2011

[URL 3]

Mann, S., Flutung und Verwahrung der ehemaligen Uran Grube Königstein/Sachsen, URL: <http://www.bwk-bund.de/fileadmin/Dokumente/Veranstaltungen/Kongresse/2009/FF-1-Sanierungsbergbau/FF1-Mann-K%F6nigstein.pdf>, verfügbar am 16.06.2011

[URL 4]

Hoyle, B., Geomicrobiology, URL: <http://science.jrank.org/pages/3030/Geomicrobiology.html>, verfügbar am 17.06.2011

[URL 4]

Heiman, M., Webcutter 2.0, URL: <http://bio.lundberg.gu.se/cutter2>, verfügbar am 18.04.2011

[URL 5]

NCBI, Basic Local Alignment Search Tool, URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, verfügbar am 16.09.2011

[URL 6]

EBI, ClustalW2 – Multiple Sequence Alignment, URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, 18.04.2011

[URL 7]

Apprill, A., ARB Workshop at C-MORE: Analysis of microbial sequence data using ARB, URL: <http://www.arb-home.de/documentation.html>, verfügbar am 24.09.2011

[URL 8]

Verfasser unbekannt, Wismut-Sanierung Schlema, URL: <http://www.medienservice.sachsen.de/medien/news/155473>, verfügbar am 25.09.2011

[URL 9]

Verfasser unbekannt. Die Sanierung und Flutung der Grubenfelder um Aue, URL: http://www.wismut.de/de/nl-aue_flutung.php, verfügbar am 25.09.2011

[URL 10]

Verfasser unbekannt, *Desulfovibrio*, URL: <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/2993>, verfügbar am 03.04.2011

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Mittweida, den

Liana Rommel

Anlagen

Anlage 1: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Proben.....	VIII
Anlage 2: Gelelektrophorese der Klone 1-150 (amplifiziert mit den Primern T3/T7).....	XII
Anlage 3: Elektropherogramme der T-RFLP-Analyse der Zusatzproben	XVI
Anlage 4: Ausgewählte Klonsequenzen der Probe k-8040.....	XX
Anlage 5: BLAST-Ergebnisse der Klonsequenzen der Probe k-8040.....	XXVI

Anlage 1: Detektierte Gruppen von Bakterien in den Proben

Probe	Enzym			relative Häufigkeit [%]	Gruppe	Charakteristik
	AluI	HaeIII	HhaI			
TV2-PL6	/	/	92,73	30,9	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AF193026]	Sulfatreduzierer
	/	/	169,96	35,1	<i>Acidobacteriaceae</i> [DQ355184]	Aerobe Heterotrophe
	64,39	/	/	37,2	<i>Heliobacillus mobilis</i> [AB100835]	Stickstofffixierer
	/	/	60,97	33,9	<i>Rhizobium</i> sp. [AF331662]	Stickstofffixierer
FluWa	170,19	/	204,19	36,3	<i>Acidithiobacillus</i> sp. [DQ062116] [DQ901260]	Eisenoxidierer (autotroph)
Ablauf-SS	143,79	193,94	/	50,0	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer
	/	/	59,99	30,1	<i>Rhizobium</i> sp. [AF331662]	Stickstofffixierer
	/	/	202,17	27,5	<i>Pseudomonas</i> sp. [AY014821]	Aerobe/fakultativ anaerobe Heterotrophe
	144,64	/	/	13,4	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer
KMP2-SS	241,25	/	/	11,6	evtl. <i>Desulfotomaculum</i> [EF446257]	Sulfatreduzierer (autotroph)
	/	205,96	87,83	34,7	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AF193026]	Sulfatreduzierer
	/	/	211,49	22,2	Uncultured candidate division bacterium [EF205501]	/
	/	76,75	/	31,7	<i>Thiobacillus</i> sp. [DQ145970]	Eisenoxidierer (autotroph)
k-8040	/	64,3	173,79	10,0	<i>Gloeobacter violaceus</i> [BA000045]	Cyanobakterien
	/	/	64,52	20,7	<i>Rhizobium</i> sp. [AF331662]	Stickstofffixierer
	/	252,69	205,55	14,3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> [DQ062116]	Eisenoxidierer (autotroph)
	/	/	365,36	7,8	evtl. <i>Desulfotomaculum</i> [EF446257]	Sulfatreduzierer (autotroph)
Cracker	/	199,06	/	39,3	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AF193026]	Sulfatreduzierer
	/	/	144,21	3,0	<i>Alicyclobacillus tolerans</i> [AB222265]	Aerobe Heterotrophe
	/	218,07	193,72	28,6	<i>Alicyclobacillaceae</i> [EF042582]	Aerobe Heterotrophe
	144,05	/	340,25	7,4	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer

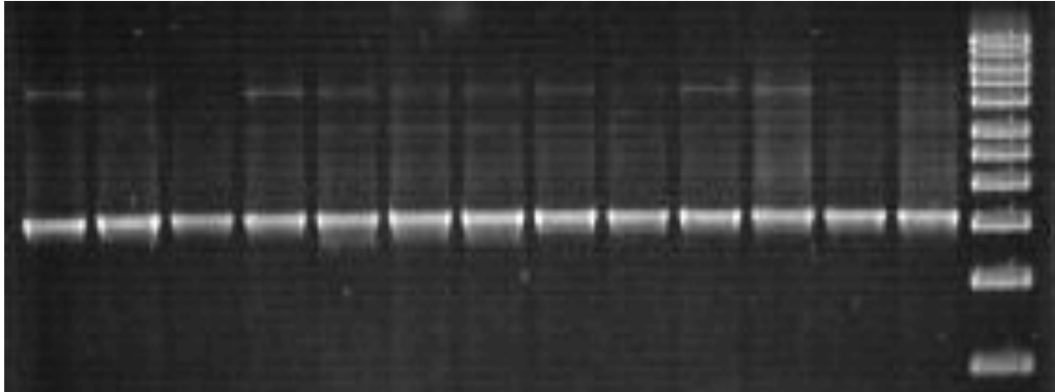
TV3-PS16	/	311,93	235,45	8,6	<i>Staphylococcus</i> sp. [AJ704792]	Fakultativ anaerobe Heterotrophe
	169,81	/	/	27,9	<i>Ferrovum myxofaciens</i> [EF133508]	Eisenoxidierer (autotroph)
	/	/	144,89	6,0	<i>Alicyclobacillus tolerans</i> [AB222265]	Aerobe Hetrotrophe
	242,65	/	/	25,7	<i>Actinobacterium</i> sp. [AB254793]	Aerobe Heterotrophe
	159,57	/	70,6	29,4	<i>Acidobacterium</i> sp. [AF200698]	Aerobe Heterotrophe
	/	299,77	227,83	12,7	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i> [AB059679]	Aerobe Heterotrophe
Schlamm	143,3	196,63	/	21,7	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer
	225,84	/	/	11,7	<i>Desulfatirhabdium butyrativorans</i> [DQ146482]	Sulfatreduzierer (autotroph)
	/	200,55	92,9	8,9	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AF193026]	Sulfatreduzierer
	/	263,87	207,68	7,9	<i>Acinetobacter</i> sp. [AY043369]	Aerobe Heterotrophe
	230,91	/	/	7,4	<i>Gallionella capsiferriformans</i> [DQ386262]	Eisenoxidierer (autotroph)
	/	/	60,73	6,3	<i>Rhizobium</i> sp. [AF331662]	Stickstofffixierer
TV3-PS16	218,87	/	/	3,9	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> [AF002671] / <i>Syntrophobacter sulfatireducens</i> [AY651787]	Sulfatreduzierer
	/	310,94	/	14,3	Uncultured bacterium clone G58 [AF407708]	/
	/	/	529,32	30,6	<i>Leptolinea tardivitalis</i> [AB109438]	Anaerobe Heterotrophe
	/	/	358,16	6,6	Uncultured actinobacterium [EF019079]	Aerobe Heterotrophe
	63,98	/	/	6,7	<i>Gloeobacter violaceus</i> [BA000045]	Cyanobakterien
	143,69	/	/	71,8	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer
P5-Schlamm	/	64,83	/	5,2	<i>Gloeobacter violaceus</i> [BA000045]	Cyanobakterien
	/	200,23	/	9,8	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AF193026]	Sulfatreduzierer
	/	311,8	/	7,2	<i>Staphylococcus</i> sp. [AJ704792]	Fakultativ anaerobe Heterotrophe
	/	/	63,84	10,3	Unidentified eubacterium [U81754]	/
	/	244,37	/	28,2	Uncultured bacterium clone [AF407708]	/
	/	/	357,87	20,6	Uncultured actinobacterium [EF019079]	Aerobe Heterotrophe

	171,06	/	/	8,5	<i>Ferroplasma myxofaciens</i> [EF133508]	Eisenoxidierer (autotroph)
	63,79	/	/	4,7	<i>Heliobacillus mobilis</i> [AB100835]	Stickstofffixierer
	/	/	205,96	15,4	<i>Acinetobacter</i> sp. [AY043369] / <i>Pseudomonas</i> sp. [AY014821]	Aerobe / fakultativ anaerobe Heterotrophe
Schlamm Einlauf SS	72,36	259,55	/	13,2	<i>Acinetobacter</i> sp. [AY043369]	Aerobe Heterotrophe
	110,58	196,58	/	/	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796] / <i>Mesorhizobium</i> sp. [AY230775]	Thiosulfatoxidierer / Stickstofffixierer
	/	/	60,18	16,1	<i>Rhizobium</i> sp. [AF331662]	Stickstofffixierer
	64,24	/	/	7,1	<i>Heliobacillus mobilis</i> [AB100835]	Stickstofffixierer
	/	/	211,13	6,6	Uncultured candidate bacterium [EF205501]	/
	159,68	/	/	3,3	<i>Acidobacterium</i> sp. [AF200698]	Aerobe Heterotrophe
	56,14	/	/	11,6	Uncultured bacterium [AB177143]	/
	/	/	141,44	2,7	<i>Alicyclobacillus tolerans</i> [AB222265]	Aerobe Heterotrophe
	/	200,28	/	4,7	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AF193026]	Sulfatreduzierer
	144,25	/	/	6,26	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer
	237,07	254,07	605,79	1,55	Uncultured bacterium [AY959018]	/
	152,91	228,3	/	2,34	Uncultured actinobacterium [EF019079]	Aerobe Heterotrophe
F413 Pöhla	65,16	/	547,29	3,65	<i>Heliobacillus mobilis</i> [AB100835]	Stickstofffixierer
	285,08	237,5	/	1,23	Uncultured bacterium [EF446257]	/
	/	185,61	/	3,81	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> [AF251436]	Eisenoxidierer
	185,73	/	/	2,17	Uncultured bacterium [AF443573]	/
	/	245,46	/	2,72	Uncultured bacterium clone G58 [AF407708]	/
	/	/	65,17	1,88	Unidentified eubacterium clone vadinHB76 [U81754]	/
	/	/	185,56	2,35	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone [DQ463718]	/
	73,28	210,68	376,85	32,14	<i>Desulfotobacterium hafniense</i> [NC_007907] [AF357919]	Schwefelreduzierer

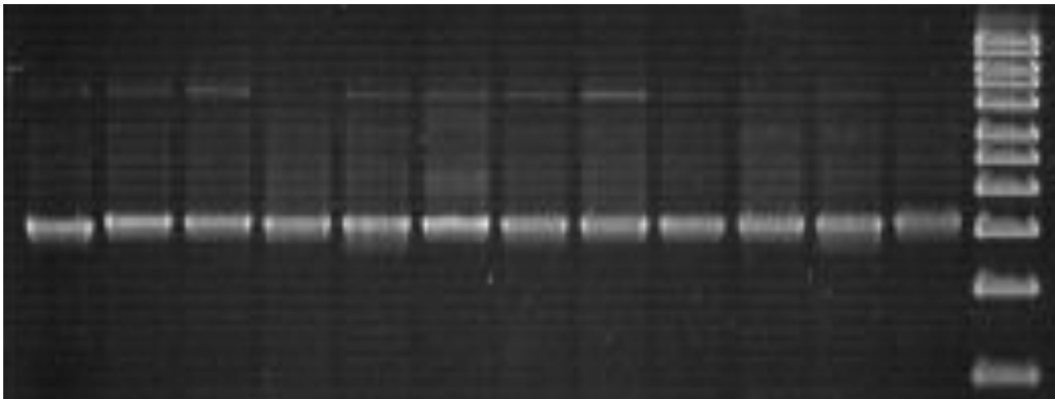
F510P Schlema	106,52	/	61,14	8,24	<i>Mesorhizobium</i> sp. [AY230775] [AB240360]	Stickstofffixierer
	/	296,91	204,02	1,33	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i> [AB059679]	Aerobe Heterotrophe
	/	229,27	/	6,98	<i>Acidimicrobiaceae</i> [EF042583]	Aerobe Heterotrophe
	252,62	145,36	95,49	/	<i>Desulfomonile tiedjei</i> [AM086646] / <i>Syntrophobacter sulfatireducens</i> [AY651787]	Sulfatreduzierer
	279,5		567,83	2,46	<i>Bacterium</i> ML1-45 [DQ145967]	/
	234,33	201,94	/	/	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> [DQ062116] / <i>Thiobacillus</i> sp. [DQ145970] / <i>Ferroplasma myxofaciens</i> [EF133508] [HM044161] / Uncultured bacterium [DQ901260] [AF353297]	Eisenoxidierer (Autotroph)
	72,42	253,8	/	7,6	<i>Acinetobacter</i> sp. [AY043369]	Aerobe Heterotrophe
	/	371,13	205,67	7,76	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> [DQ909079]	Eisenoxidierer (Autotroph)
	234,4	75,36	367,9	11,91	<i>Thiobacillus</i> sp. [DQ145970]	Eisenoxidierer (Autotroph)
	245	/	89,71	4,01	<i>Desulfovibrio</i> sp. [AJ133797]	Sulfatreduzierer
	203,9	262,02	/	13,39	<i>Solirubrobacter soli</i> [AB245334]	Aerobe Heterotrophe
	250,52	/	92,61	7,59	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> [AF002671]	Sulfatreduzierer
	257,67	/	/	1,53	<i>Desulfitobacterium</i> sp. [AF357919]	Schwefelreduzierer
	/	/	60,37	2,08	<i>Rhizobium</i> sp. [AF331662]	Stickstofffixierer
	145,47	/	/	4,92	<i>Bosea thiooxidans</i> [AJ250796]	Thiosulfatoxidierer
	/	287,73	/	2,61	<i>Heliobacillus mobilis</i> [AB100835]	Stickstofffixierer
	/	218,52	568,79	/	<i>Ferroplasma myxofaciens</i> [EF133508] [HM044161] / Uncultured bacterium [DQ901260] [AF353297]	Eisenoxidierer (Autotroph)
	232,13	217,45	/	/	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i> [AB059679] / <i>Gallionella capsiferiformans</i> [DQ386262]	Aerobe Heterotrophe/ Eisenoxidierer (Autotroph)

Anlage 2: Gelelektrophorese der Klone 1-150 (amplifiziert mit den Primern T3/T7)

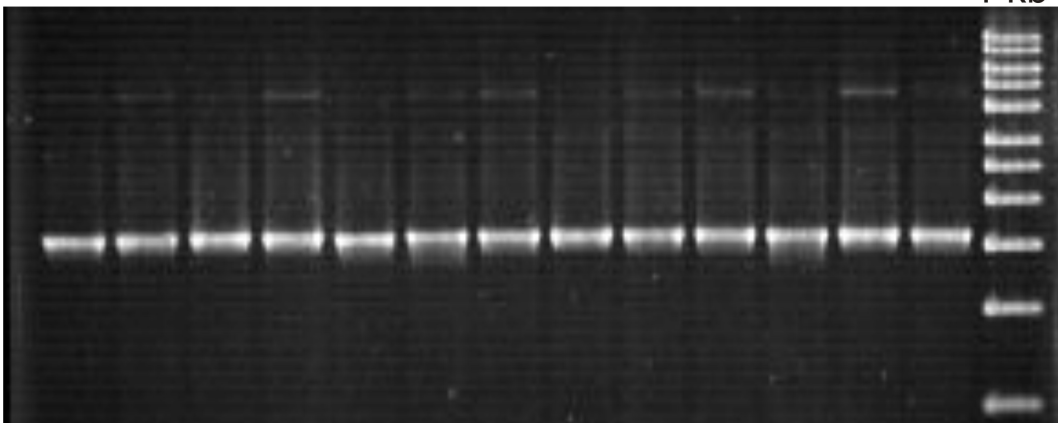
Klon 1 Klon 2 Klon 3 Klon 4 Klon 5 Klon 6 Klon 7 Klon 8 Klon 9 Klon 10 Klon 11 Klon 12 Klon 13 1 kb

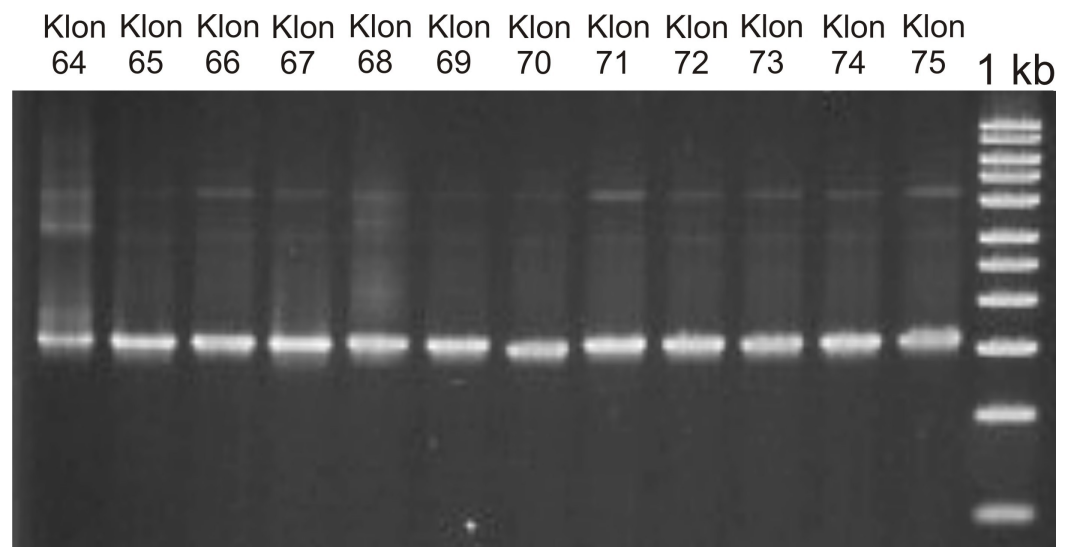
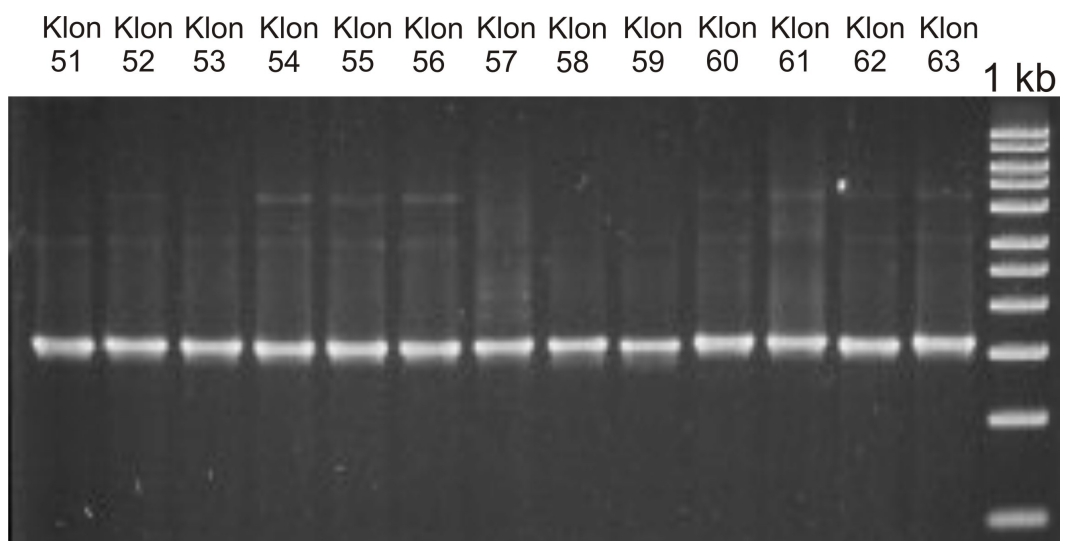
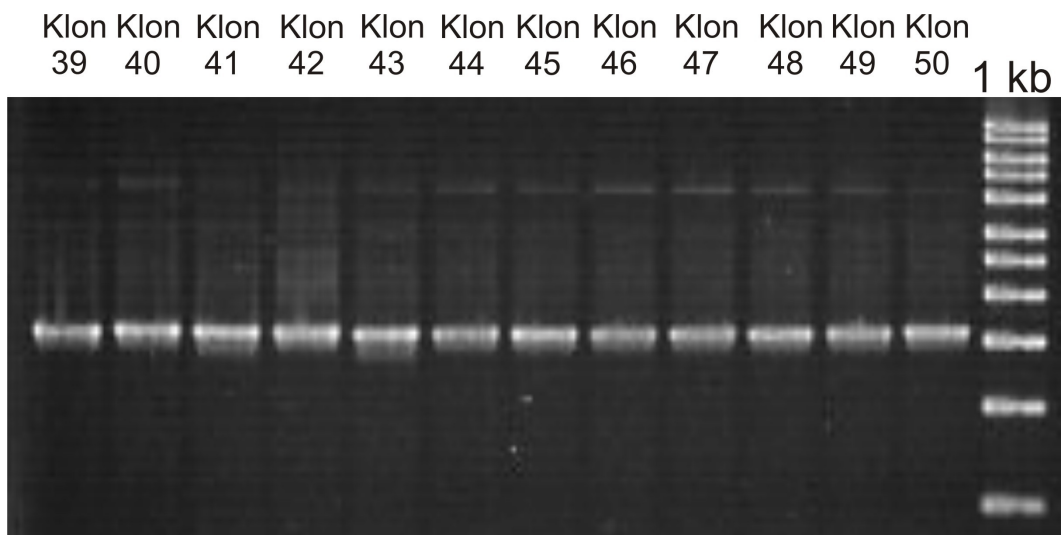


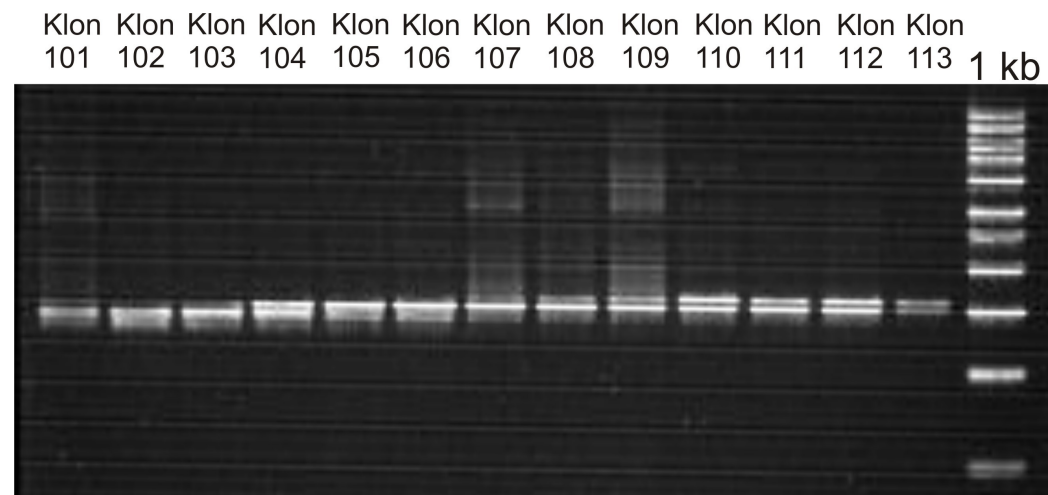
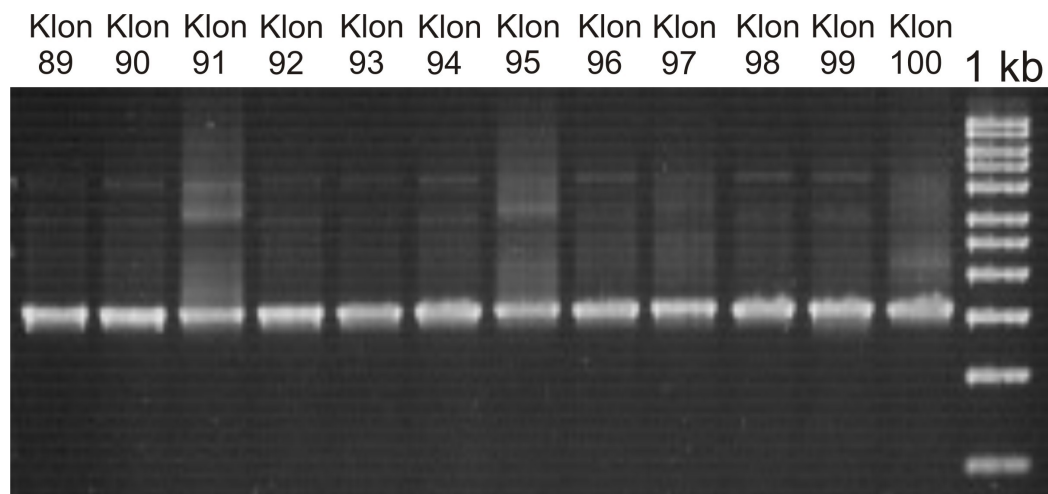
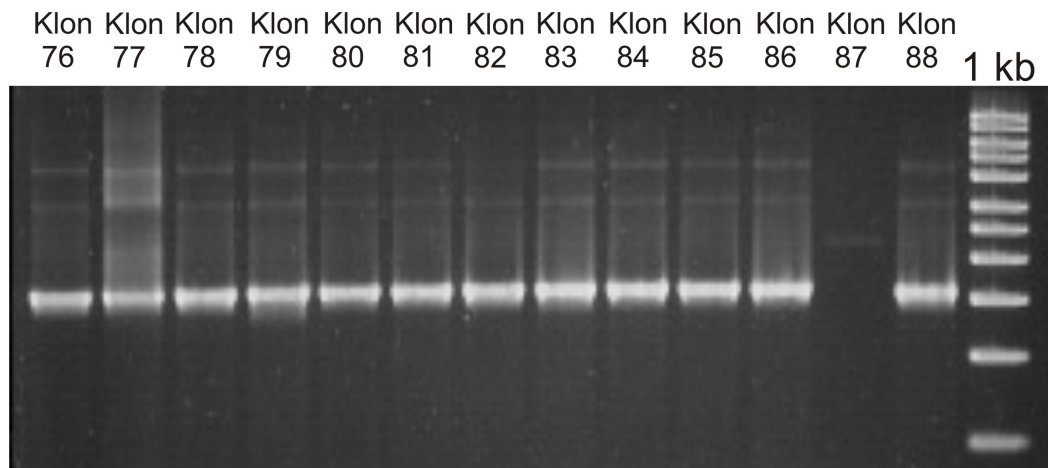
Klon 14 Klon 15 Klon 16 Klon 17 Klon 18 Klon 19 Klon 20 Klon 21 Klon 22 Klon 23 Klon 24 Klon 25 1 kb



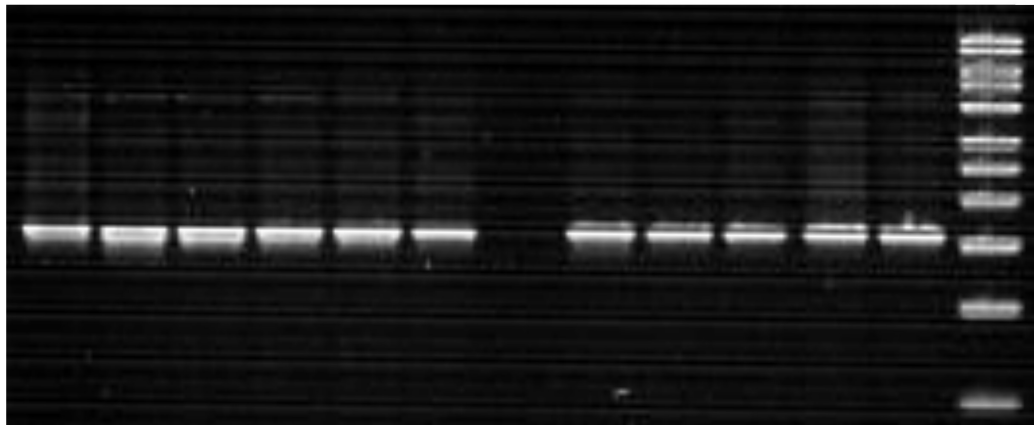
Klon 26 Klon 27 Klon 28 Klon 29 Klon 30 Klon 31 Klon 32 Klon 33 Klon 34 Klon 35 Klon 36 Klon 37 Klon 38 1 kb



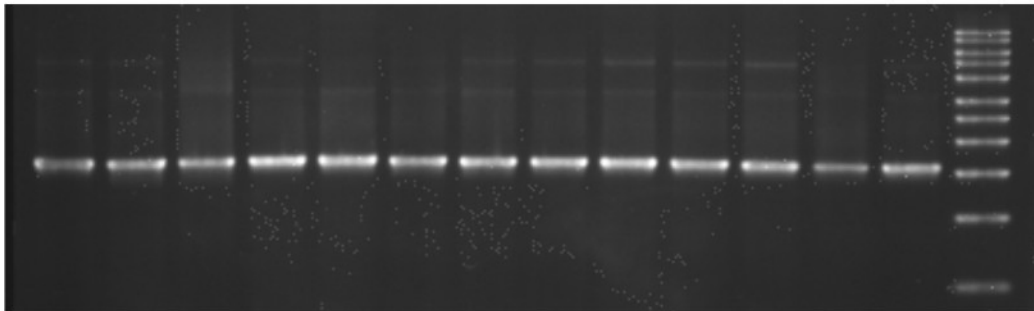




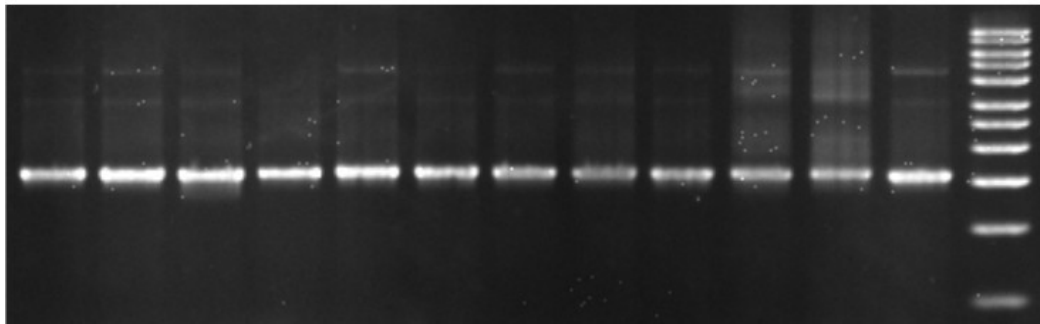
Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon
114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 1 kb



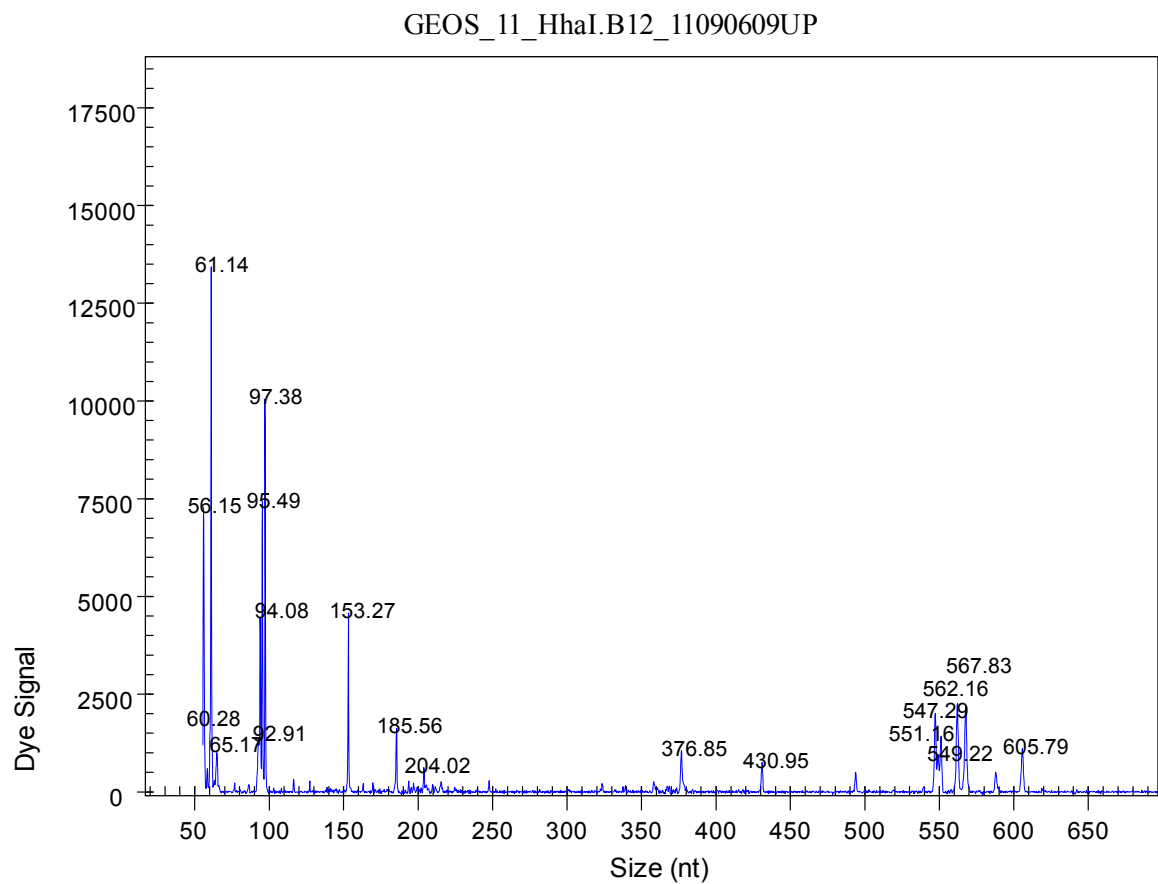
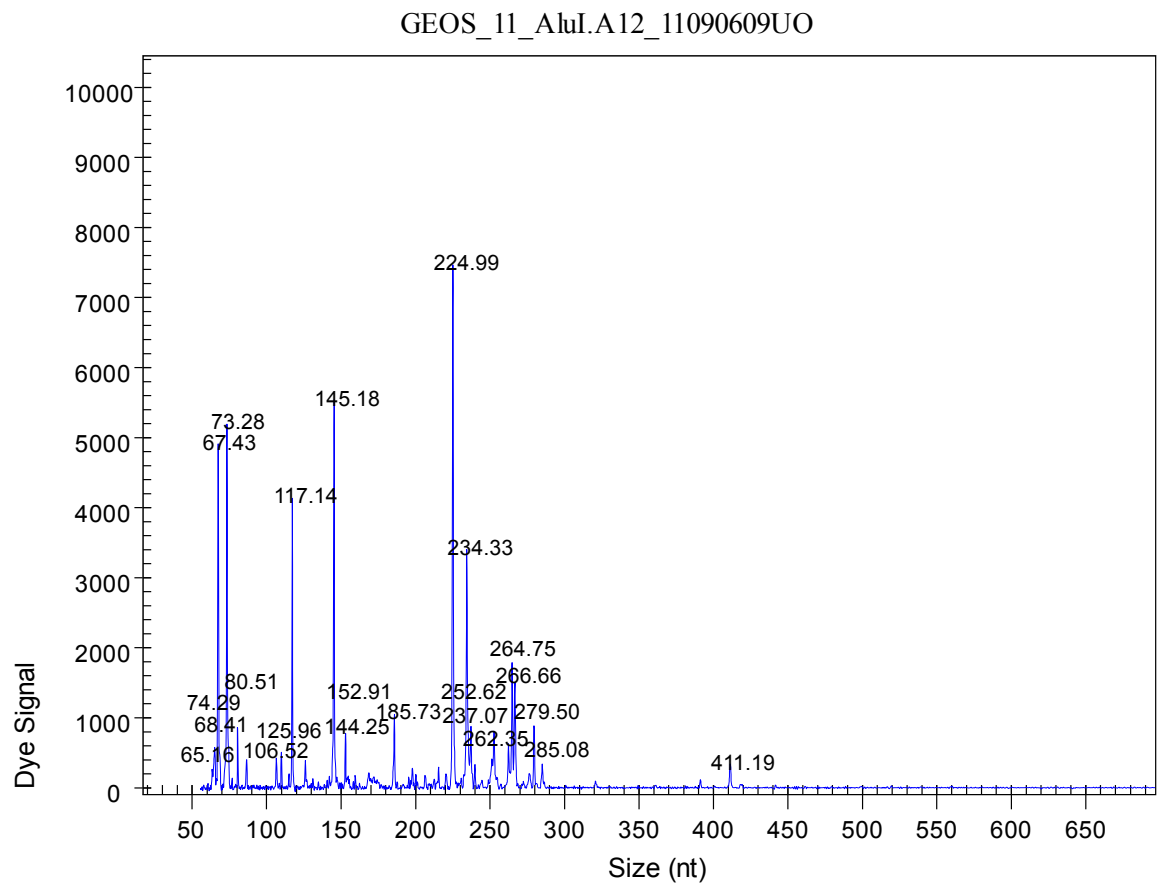
Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon
126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 1 kb



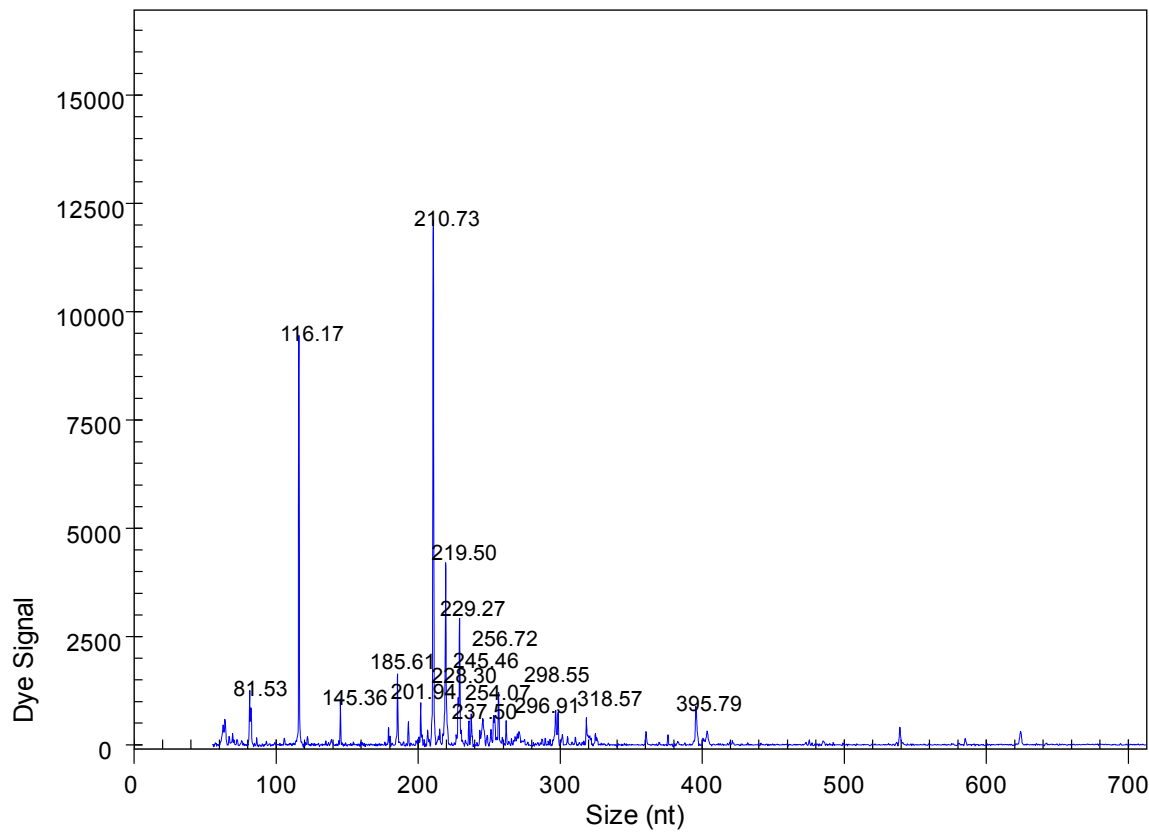
Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon Klon
139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 1 kb



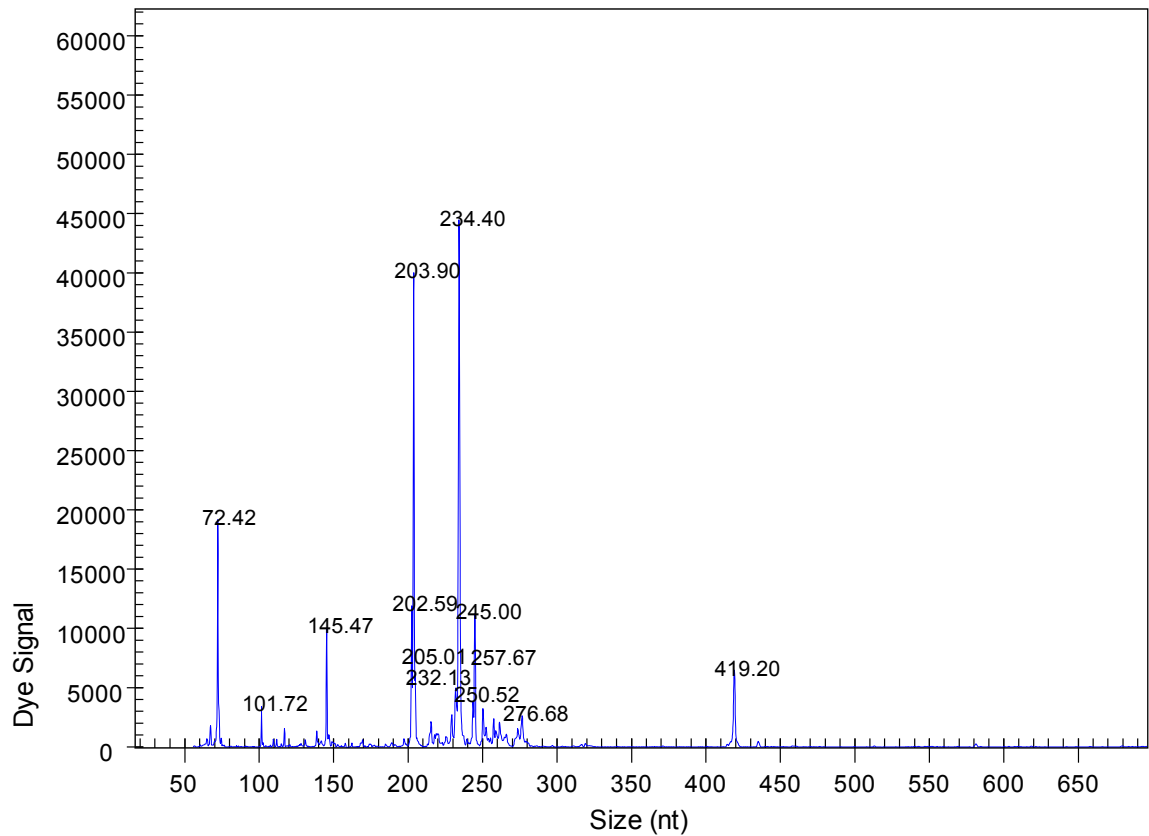
Anlage 3: Elektropherogramme der T-RFLP-Analyse der Zusatzproben



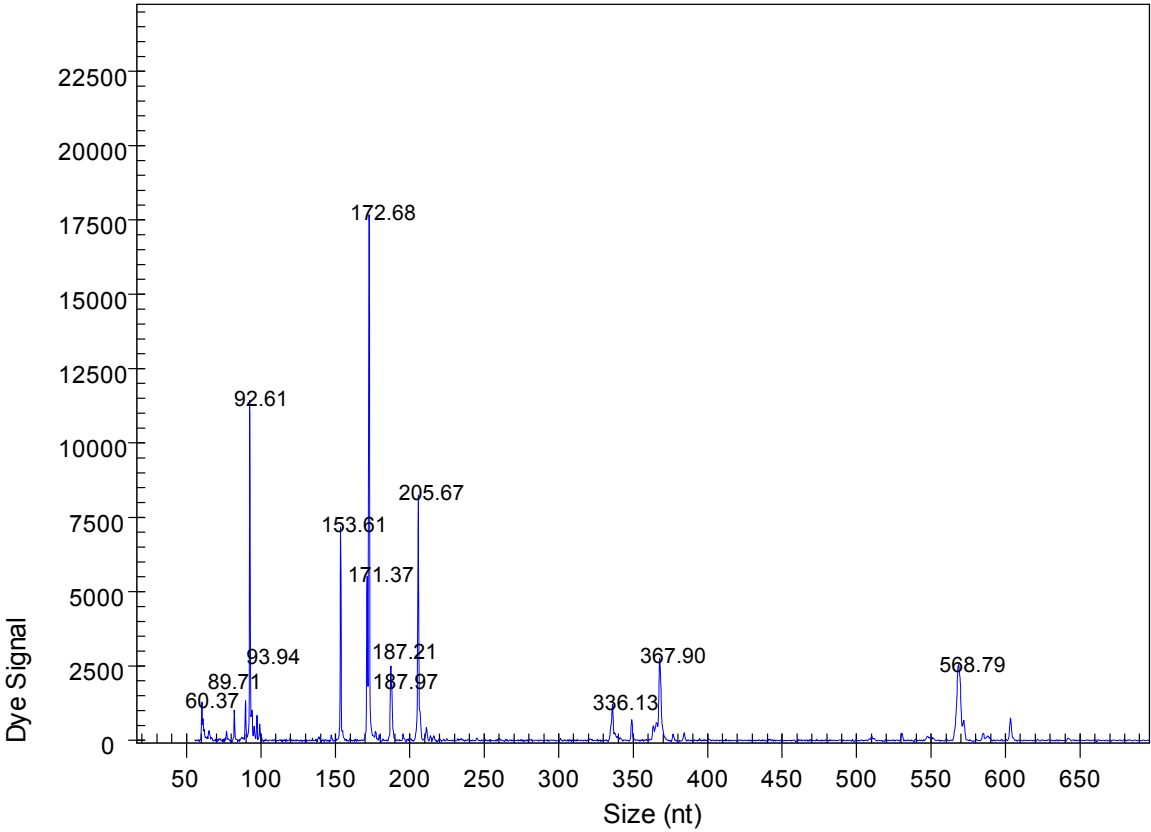
GEOS_11_HaeIII.C12_11090609UQ



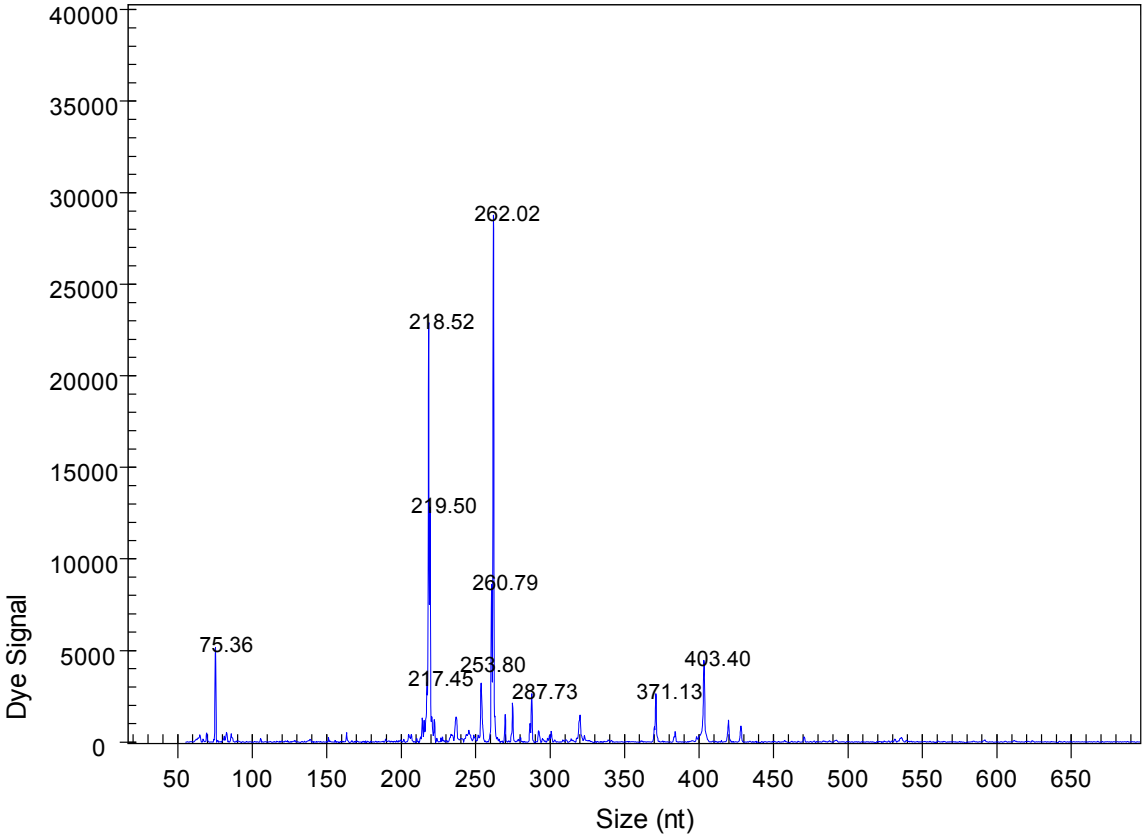
GEOS_12_AluI.D12_11090609UR

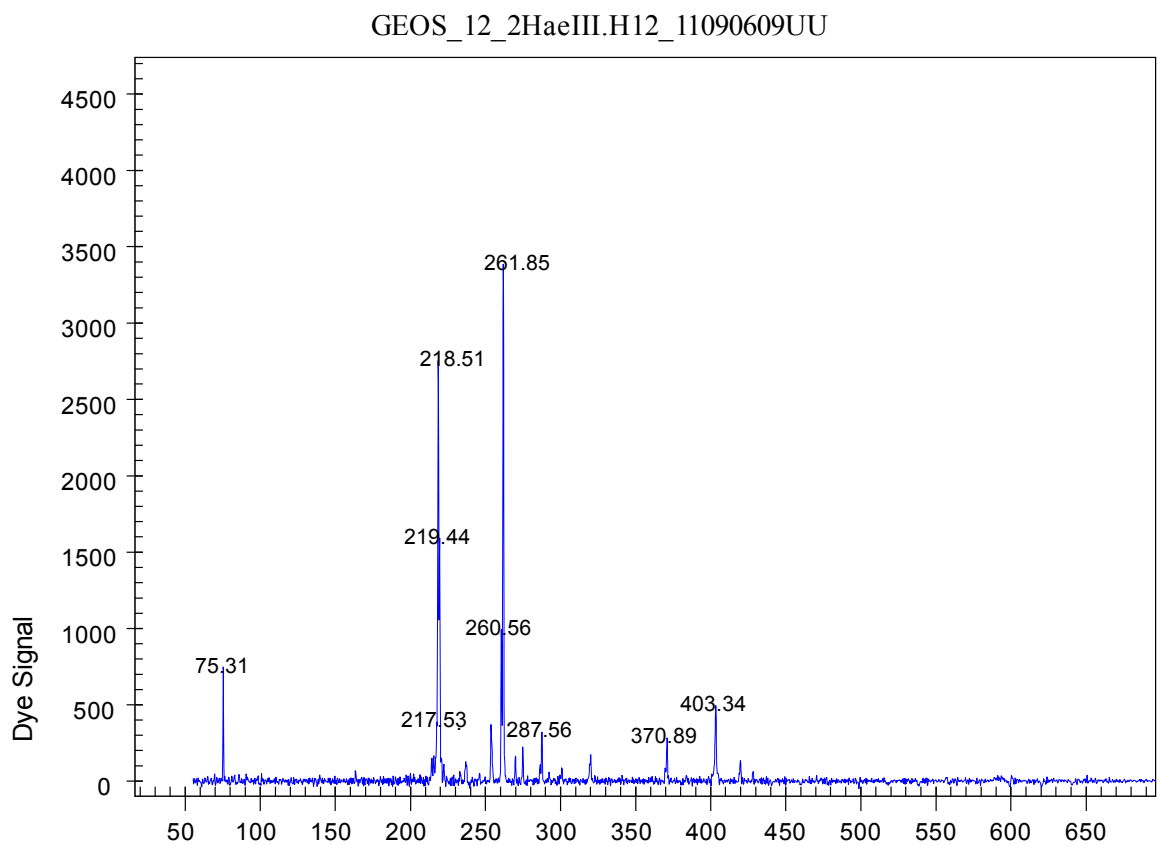
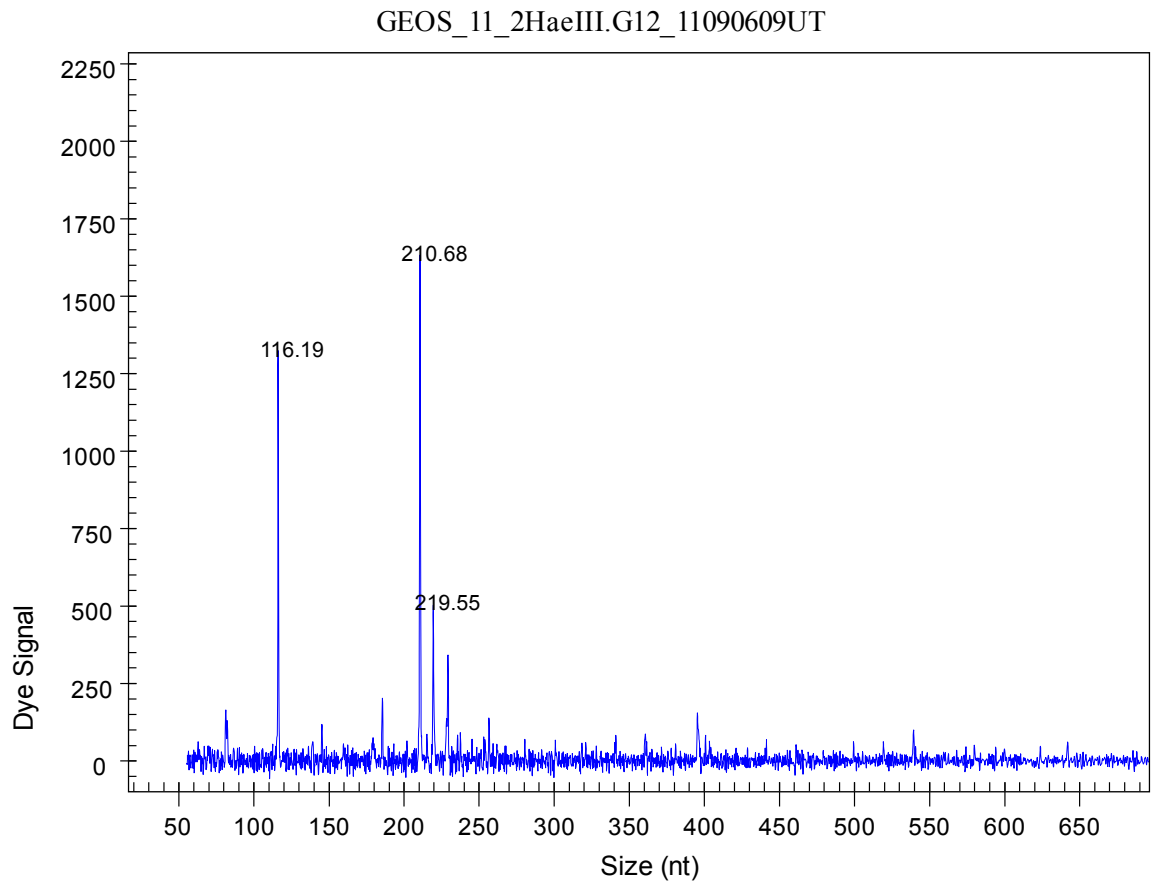


GEOS_12_HhaI.E12_11090609UR



GEOS_12_HaeIII.F12_11090609US





Anlage 4: Ausgewählte Klonsequenzen der Probe k-8040

> WIS1_H11-T3 WIS1_H11.0.1

GTTGTTGGGCAACTTGATTGTTTCAGTAACGAAGCTAACGCGAGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAT
TCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAAGTCTGCTGAGAGGTGGATGTG
CCTGAAAGGGAACCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTATTAATTGCCATCATTAAGTTGGGCACCTTTAATAGGA
CTGCTGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGC
TTCACACGTCATACAATGGCCGGTACAGAGGGATGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCTCAGAAA
GCCGGTCGTAGTCCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCAAGGGCGAATTCCA

> WIS1_A03-T3 WIS1_A03.0.1

GCGAAGGCGCCTTGCTGGACGAAACCTGACGCTGAGGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTCGGAGGGTACCACCTCCGGTGCC
GAAGGAAACCCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGA
CTTGACATCGGTGTGATCGGCGCAGAGATGCGTCTTCCCTTCGGGGCACACTAGACAGGTGGTGCA
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTT
GTGTTACCAGCGCGTGATGGCGGGGACTCACAAATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAC
GGGAGCGAAAGAGCGATCTGGAGCCAACTCTGAAAGCCGTTCTAGTTTCGGATTGCAGGCTGCA
ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCC

> WIS1_F07-T3 WIS1_F07.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGC
ACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGCCGGAACGTATCCAGTAGAGG
GGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAGCATGGGATCTTCG
GACCATGCGTTATTGGAGCGGCCGACGTCTGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTAGGC
GATGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGAG
GATGAAGGCCTTAGGGTCGTAACTCCTTTTCAGCAGGAACGAAAATGACGGTACCTGCAGAAGAAG
CTCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGGCAAGTCGGATGTGAAACCCCCAGGCTTAACCTGGGGCCG
CCATTCGATACTGCTATGGCTTGAGTTCGGTAGGGGATTG

> WIS1_C02-T3 WIS1_C02.0.1

GATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGGTGTTGGGGGAGGAGACTTCCTTAGTA
CCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATTATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCA
CCCTTGACATGTCTAGGAAGATTTTCAGAGATGAGATTGTGCCCGAAAGGGAACCTGAACACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
TCATTAATTGCCATCATTCAGTTGGGCACCTTAAATGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTAATACAATGGTCGGTACA
GAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCTCAGAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG
CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCTCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCCTTGTACACTCCGCCCAAGGGCGAATTCCACAGTGGATATCAAG

> WIS1_A11-T3 WIS1_A11.0.1

ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTGCTG
GACAGTGCCTGACGCTGAGGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCGGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTCTGGAGGGTACCACCTCCGGTGCCGAAGGAAACCCAATAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
AGTGGAGCATGTGGTTTAACTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCCCCCTGAC
GGGCCGAGAGATCGGTCTCCCTTCGGGGCAGGGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCAGTGTTACCAGCACGTAA
AGGTGGGGACTCACTGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCCCTTATGTCCTGGGCCACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAACGGGAAGCAAGAGAGCGA
TCTGGAGCGAAACCTAAAAGCCGTTTCGTAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACCCGCTGCATGAAGC
CGGAATTGCTGGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCC

> WIS1_F04-T3 WIS1_F04.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCT
CGCAAGAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCGCTGGAATGGGGATAACG
CCTGGAAGCGGGTGCTAATCCCGAATGGTTTCCCTTTGCCGCATGGCAGAGGAAGGAAAGGCGCTAC
GGCGCCGTCCAACGAGGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCCG
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGACGGTCCTCGGATTGTAAAGCTCTGTCAATTGGGACGAGTGACGGCGAGAGGGAATGTTGCCCG
TGAGACGGTACCGATGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGG
GCAAGCGTTGTCCGGAATGACTGGGCGTAAAGC

> WIS1_B01-T3 WIS1_B01.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCC
CTTCGGGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGGCATCAAGTGGGGGATAACG
CCTGGAAACGGGTGCTAATTCCGCATAGGCTCTTTGCTCGCATGAGTGAAGAAGGAAAGGCGCTAA
GGCGTCGCTTGATGATGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGA
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGCGAATGA
AGACGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCTGTCAATTGGGGACGAAGTAGGGAGAGAGGGAATGCTCTTCT
AGAGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGG
GCAAGCGTTGTCCGGAATGACTGGGCGTAA

> WIS1_C04-T3 WIS1_C04.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGATTGAACGCTGGCGGTATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGATCA
AGAAGCTTGCTTCTTTGGTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACATATCCGGAAGTGGGG
GATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATATGCCCTGAGGGGGAAAGGGGGGGATCACAAGA
CCTCTCGCTTTCGGAGTGGCCGATATCGGATTAGCTAGATGGTGAGGTAAAGGCTCACCATGGCGA
CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAGTGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGAGTGA
AGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTTTCAGCCGGAAGAAATCGCATTCTTAATACGGGGTGTG
GATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTTTAAGCCAGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA

> WIS1_E03-T3 WIS1_E03.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGC
ACGGACCTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGCCGGAACGTATCCAGTAGAGG
GGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAGCATGGGATCTTCG
GACCATGCGTTATTGGAGCGGCCGACGTCTGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTAGGC
GATGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATTCCGCGTGAGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTTTCGGCAGGGAAGAAAAGGTATTGGTTAATAGCTGATA
CTGCTGACGGTACCTGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGG
GTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCGCAGGCGGCTCTGTAAGTCTGACGTGA
AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCGTTGGA

> WIS1_F01-T3 WIS1_F01.0.1

CCGAAGGAAACCCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGCCCCGCACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAG
 GACTTGACATCGGTGTGATCGGCGCAGAGATGCGTCTTCCCTTCGGGGCACACTAGACAGGTGGTG
 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAT
 TTGTGTTACCAGCGCGTGAAGGCGGGGACTCACAAATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCG
 GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGGTACA
 ACGGGGAGCGAAAGAGCGATCTGGAGCCAAACTCTGAAAGCCGTTCTAGTTTCGGATTGCAGGCTG
 CAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCAAGGGCGAATTCC

> WIS1_F02-T3 WIS1_F02.0.1

GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGACTGCTTGATGTGGCGGGTACC
 CAATCCTGCCGTGTGGAAGCTAACGCGTTAAGCAGTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCTGGGCTCGAAATGTACAGGAATCCGGTGGAACATCGGCGTCCCGCAAGGGACCT
 GTATATAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTACCCCCAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTGGTGGAACCGCCTCGGATAACG
 GGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGCCGGTACAAACCGCTGCAAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCGGAAAAAGCCGGCCTCAGTTTCG
 GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCG
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACTCCGCCCAAGGGCGAAT

> WIS1_H10-T3 WIS1_H10.0.1

TTGGTAACGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAA
 GGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGATTATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCT
 TACCTACCCTTGACATGTACGGAAGACTGCAGAGATGTGGTTGTGCTTGAAAGAGAACCGTAACAC
 AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
 CCCTTGTCTAATTAATTGCCATCATTCAGTTGGGCACTTTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
 AAGGCGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGCAGGGCTTCACACGTAATACAATGGTC
 GGTACAGAGGGTTGCGAAGTTGCGAGATTGAGCCAATCCAGAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGT
 AGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGCGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGCCTTGTACACTCCGCCCAAGGGCGAATTCCAC

> WIS1_H12-T3 WIS1_H12.0.1

CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT
GATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTGCTCTTGACATGTTAGGAAGACCTAAG
AGATTAGGTTGTGCCGCAAGGAACCTAATCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG
AGATGTTGTCTTAAGTGACGCAACGAGCGCAACCCTTACTACTAGTTGCCCCAATCAAGTTTGGCA
CTCTAGTGGGACTGCTGGTGTTTAACCAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTT
ATGAGCAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTAGGTACAGACGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCT
AATCCGAGAAAGCCTATCGTAGTCCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCAAGGGC
GAAT

> WIS1_D05-T3 WIS1_D05.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAC
AGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTGTCTTTTAGTGGGG
GACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCCTGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTTCGGA
CCTCGCGCTAAGAGAGGAGCCTACGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGA
CGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGA
AGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGGTGGGTCTAATACAATCTGCT
ATTGACGTGAATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGT
GCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTACGTTA

> WIS1_B09-T3 WIS1_B09.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGATTGAACGCTGGCGGTATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGATTT
GGGGGCTTGCTCCCAGGTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACATATCCGGAAGTGGGG
GATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATATGCCCTGAGGGGGAAAGGGGGGGATCGCAAGA
CCTCTCGCTTTCGGAGTGGCCGATATCGGATTAGCTAGATGGTGAGGTAAAGGCTCACCATGGCGA
CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGAGTGA
AGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTTTCAGCCGGAAAGAAATCGCATTCTTAATACGGGGTGTG
GATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGTTTCTTAAGCCAGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAAC

> WIS1_A09-T3 WIS1_A09.0.1

TGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCTGTCTTACCAAACCGCCTGCGCACGCTTTAC
GCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG
GTGCTTCTTCTTCCGGTACCGTCATCTACTCCTAGTATTAATAGAAGCAATTTCTTTCCGGCTGAA
AGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACTCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTG
TCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCGGGT
CGTCTCTCAGACCCGCTACGGATCGTCGCCATGGTGAGCCTTTACCCACCATCTAGCTAATCCG
GTATCGGCCACTCCGAAAGCGAGAGGTCTTGCGATCCCCCCTTTCCCCCTCAGGGCATATGCGGT
ATTAGCGTAACTTTTCGCTACGTTATCCCCACTTCCGGATATGTTCCGATATATTACTCACCCGTT
CGCCACTAACCTGGGAGCAAGCCCCAAGCCCGTTGCACTTGCATGTGTAAAGCATAACGCCACGCG
TTCGATCTGACCCAGGATCAAACCTCT

> WIS1_E04-T3 WIS1_E04.0.1

AGAGTTTGATCCTGGGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTTTA
TAAGGGCTTGCCCTTATAGATAGTGGCGAACGGGTGCGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCAAAGTT
TGGAATAACACCGGGAAACCGATGCTAATACCAAATATGCTCACACTATCACAAAGATAGAGTGAGG
AAAGTTTTTCGCTTTGGGAGGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCATCGACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGG
AGGATGAAGGCCTTAGGGTCGTAAACTCCTTTTCAGCAGGAACGAAAATGACGGTACCTGCAGAAGA
AGCTCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT
TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGGCAAGTCGGATGTGAAACCCCCAGGCTTAACCTGGGGC
CGCCATTCGATACTGCTATGGCTTGAGTTCGGTAG

Anlage 5: BLAST-Ergebnisse der Klonsequenzen der Probe k-8040

Klon	Max. Identität	Organismus	Acession Number
A01	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
A02	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
A03	100 %	Uncultured bacterium, clone A130306G06	FN860717
	95 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
A04	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-461	FN870328
A05	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
A06	100 %	Uncultured bacterium, clone B216406D04	FN863252
	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
A07	99 %	Acid streamer iron-oxidizing bacterium CS11	AY765999
	98 %	Uncultured <i>Acidimicrobiaceae</i> ORCL3.9	EF042583
A08	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp.	AM167950
A09	99 %	Uncultured bacterium, clone CGA6Wt67c	FR677004
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone TrefC4	AY766002
A10	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp.	AM167950
A11	99 %	Uncultured <i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium	GU229856
A12	99 %	Uncultured bacterium, clone CMSd20	AM988806
	98 %	Uncultured <i>Alicyclobacillaceae</i> S3BC11	GU229858
B01	99 %	Uncultured <i>Alicyclobacillus</i> sp. clone K23_bac	EF464642
B02	97 %	Uncultured beta proteobacterium clone ADK-BTh02-80	EF520449
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62A12	GQ390167
B03	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
B04	99 %	Uncultured bacterium clone ORFRC-FW102-622d-2.14	FJ451608
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62A12	GQ390167
B05	99 %	Uncultured <i>Alicyclobacillaceae</i> S3BC11	GU229858
B06	99 %	Uncultured bacterium clone nbw336f11c1	GQ090655
	95 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
B07	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
B08	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
B09	98 %	Uncultured beta proteobacterium	AB475012
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62E6	GQ390168
B10	100 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
B11	96 %	<i>Alicyclobacillus contaminans</i> strain YL-5	GQ262732
B12	99 %	Uncultured bacterium, clone O228906C12	FN866553
	98 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
C01	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161

C02	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62E6	GQ390168
C03	99 %	Uncultured <i>Alicyclobacillaceae</i> S3BC11	GU229858
C04	98 %	Uncultured beta proteobacterium clone ADK-BTh02-80	EF520449
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62A12	GQ390167
C05	99 %	Uncultured bacterium clone AG_Pin_h10	EU376023
	95 %	Uncultured <i>Alicyclobacillus</i> sp. clone SN108_6	HQ730616
C06	99 %	Uncultured bacterium, clone O218406A03	FN866100
	95 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
C07	100 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
C08	96 %	<i>Acidobacteriaceae</i> bacterium KP3	AY765992
C09	99 %	Uncultured bacterium clone ORFRC-FW102-622d-2.14	FJ451608
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62A12	GQ390167
C10	99 %	Uncultured bacterium clone LRE22B11	HQ420151
	98 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
C11	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
C12	100 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
D01	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
D02	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
D03	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
D04	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone Eub62D5	GQ390166
D05	100 %	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> voucher BGR:13	GU167981
D06	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
D07	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
D08	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
D09		/	
D10	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
D11	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
D12	99 %	Uncultured bacterium clone AG_Pin_h10	EU376023
	93 %	Uncultured <i>Alicyclobacillus</i> sp. clone SN108_6	HQ730616
E01	99 %	Uncultured bacterium clone AG_Pin_h10	EU376023
	95 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
E02	95 %	Uncultured <i>Gallionellaceae</i> bacterium D12_32	EU266836
E03	99 %	Uncultured beta proteobacterium clone RGJ18	DQ336042

	95 %	<i>Thiobacillus</i> sp. ML2-16	DQ145970
E04	100 %	Uncultured eubacterium TRA2-10	AF047642
	99 %	Uncultured <i>Acidimicrobiaceae</i> bacterium clone ORCL3.9	E042583
E05	99 %	Uncultured bacterium ORFRC-FW102-622d-2.14	FJ451608
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62A12	GQ390167
E06	99 %	Uncultured beta proteobacterium clone RGJ18	DQ336042
	95 %	<i>Thiobacillus</i> sp. ML2-16	DQ145970
E07	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
E08	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
E09	99 %	Uncultured bacterium, clone O218406A03	FN866100
	97 %	Uncultured <i>Ferrovum</i> sp. clone PCF50	EU921166
E10	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
E11	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
E12	99 %	Uncultured bacterium clone AG_Pin_h10	EU376023
F01	100 %	Uncultured bacterium, clone B117006G07	FN862567
	94 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
F02	100 %	<i>Acidobacteriaceae</i> bacterium PK35	AY765993
F03	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
F04	99 %	Uncultured <i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium	GU229858
F05	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
F06	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
F07	97 %	Uncultured bacterium clone RT6-ant09-b11-W	JF737910
F08	99 %	Uncultured bacterium clone ORFRC-FW102-622d-2.14	FJ451608
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62A12	GQ390167
F09	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62E6	GQ390168
F10		/	
F11	99 %	Uncultured bacterium, clone B117006G07	FN862567
	94 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
F12		/	
G01	97 %	Uncultured bacterium, clone O239506G11	FN867136
	95 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
G02	100 %	Uncultured bacterium, clone O218706E01	FN866404
	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
G03	99 %	Uncultured <i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium	GU229858
G04	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
G05	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161

G06	99 %	Uncultured bacterium, clone O117506F11	FN865449
	98 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
G07	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
G08	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
G09	99 %	Uncultured bacterium clone GL_DU68	FJ203849
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp.	AM167951
G10	98 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone eub62E6	GQ390168
G11	99 %	Uncultured bacterium, clone CG-49	FN391843
	96 %	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium	HQ003477
G12	95 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
H01	99 %	Uncultured bacterium, clone A130306G06	FN860717
	94 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
H02	100 %	Uncultured bacterium, clone A122206D09	FN860425
H03	99 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
	96 %	<i>Gallionella ferruginea</i> 16S ribosomal RNA	L07897
H04	96 %	<i>Gallionella ferruginea</i> 16S ribosomal RNA	L07897
H05	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
H06	97 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp. clone RUGL6-416	GQ366649
	97 %	Environmental 16s rDNA sequence	CU466848
H07	95 %	Uncultured <i>Dechloromonas</i> sp. clone R15-90	JF808878
	99 %	Uncultured bacterium clone AG_Pin_h10	EU376023
	94 %	<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium FeSo-D4-20-CH	FN870328
H08	99 %	Uncultured bacterium clone LOP-83	DQ241393
H09	98 %	Uncultured <i>Gallionella</i> sp.	AM167951
		/	
H10	99 %	Uncultured bacterium, clone CG-49	FN391843
H11	96 %	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium	HQ003477
	100 %	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G	HM044161
H12	99 %	Uncultured bacterium, clone B116906F07	FN862470
	91 %	<i>Neisseriaceae</i> bacterium Lie5-2	GU199453